

**STRUKTURANALYSE DER LIPOID A KOMPONENTE
VON LIPOPOLYSACCHARIDEN
AUS YERSINIA ENTEROCOLITICA**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der biologischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
in Freiburg i. Br.**

**vorgelegt von
Michael Jensen
aus Hildesheim
1980**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

STRUKTURANALYSE DER LIPOID A KOMPONENTE
VON LIPOPOLYSACCHARIDEN
AUS YERSINIA ENTEROCOLITICA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der biologischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
in Freiburg

vorgelegt von
Michael Jensen
aus Hildesheim

1980

Dekan: Prof. Dr. H. Mohr
Leiter der Arbeit: Dr. habil. E.Th. Rietschel
Referent: Dr. habil. E.Th. Rietschel
Korreferent: Prof. Dr. G. Drews

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses: 21.2.1980

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder befinden sich im Druck:

Rietschel, E.Th., G. Greer, M. Jensen, U. Schade und Z. Sidorczyk: Struktur und Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide, *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 28 (II), Heft 7, 1203, (1978).

Jensen, M., D. Borowiak, H. Paulsen und E.Th. Rietschel: Analysis of permethylated Glucosaminyl-Glucosaminitol-Disaccharides by combined Gas-Liquid-Chromatography-Mass-Spectrometry, *Biomed. Mass. Spec.*, 6, 559-565.

Radziejewska-Lebrecht, J., U. Feige, M. Jensen, K. Kotelko, H. Fribolin und H. Mayer: Structural Studies on the Glucose-Heptose Region of the Proteus mirabilis R Core, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.

Rietschel, E.Th., K. Broady, M. Jensen, H. Wollenweber, O. Lüderitz und O. Westphal: Die chemische Struktur bakterieller Lipopolysaccharide (Endotoxine), *Z. Gastroentero.*, im Druck.

Sidorczyk, S., M. Jensen und E.Th. Rietschel: The chemical Structure of the Lipid A Component from Proteus mirabilis, in Vorbereitung.





...RICHTIG... FALSCH... RICHTIG... FALSCH

Die Gelassenheit zu den Dingen
und die Offenheit für das
Geheimnis gehören zusammen.
Sie gewähren uns die
Möglichkeit, uns auf eine ganz
andere Weise in der Welt
aufzuhalten.

Martin Heidegger

Herrn Dr. habil. E.Th. Rietschel, dem Leiter dieser Arbeit, danke ich ganz besonders für die vielen wertvollen Anregungen, Unterstützungen und fördernden Diskussionen im Verlauf der Arbeit. Aber nicht nur durch technische Ratschläge, sondern auch durch seine humorvolle herzliche Art und die ständige Hilfsbereitschaft hat er den Fortgang der Arbeit gefördert.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. O. Lüderitz, Herrn Dr. C. Galanos und Herrn Dr. H. Mayer für die vielen Ratschläge und die außerordentlich freundliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn D. Borowiak bedanken, ohne dessen Hilfe am Massenspektrographen diese Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Bei Herrn R. Warth, Fräulein Inge Minner, Frau Ulrike Pflugfelder, Fräulein C. Strohmeier und Herrn J. Beck möchte ich mich für ihre freundliche technische Hilfe bedanken. Weiterhin danke ich Herrn Dr. S. Schlecht für die Züchtung der Bakterienstämme.

Allen ausländischen Kollegen, die während dieser Zeit mit mir in der Abteilung von Herrn Dr. Rietschel arbeiteten, besonders aber den Herren Dr. Z. Sidorczyk, Dr. R. Russard und Dr. D. Shaw danke ich für zahlreiche Diskussionen und hilfreiche Ratschläge.

Besonders möchte ich mich bei Frau Lore Lay für die zahlreichen Photoarbeiten und die so oft von ihr verbreitete gute Laune bedanken.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich Frau Rosemary Schneider für die schnelle und sorgfältige Erstellung des Manuskriptes.

Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.v., Göttingen, bin ich für die finanzielle Unterstützung dankbar.

Abstract

JENSEN, MICHAEL

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DER LIPOID A-KOMPONENTE VON LIPOPOLYSACCHARIDEN AUS YERSINIA ENTEROCOLITICA

Die Lipid A-Komponente von Yersinia enterocolitica LPS besteht aus einem β -1.6 gebundenen D-Glukosamin-Disaccharid. Dies trägt am reduzierenden Glukosamin (Position 1) einen unsubstituierten Phosphatrest und am nicht reduzierenden Glukosamin einen ester gebundenen Phosphatrest, welcher teilweise (30%) mit L-4-Aminoarabinose substituiert ist. Die beiden Aminogruppen des Glukosamin-Disaccharides sind quantitativ mit D-3-Hydroxymyristinsäure substituiert. Die Hydroxylgruppen sind mit Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure acyliert. Darüberhinaus liegt in Esterbindung eine D-3-Hydroxymyristinsäure vor, die an ihrer Hydroxylgruppe mit Laurinsäure substituiert ist. Dieser D-3-Lauroxymyristinsäureester ist bisher ausschließlich in Yersinia enterocolitica Lipid A gefunden worden. In seiner Grundstruktur gleicht damit das Lipid A von Yersinia enterocolitica demjenigen von Salmonella und anderen gram-negativen Bakterien. Biologische und serologische Untersuchungen untermauerten diese Analysenergebnisse. So sind LPS und Lipid A von Yersinia enterocolitica potente Endotoxine (Pyrogenität, Letalität). Mit Lipid A-Antiserum (Salmonella) wurden im Hämolysetest, im Test der passiven Hämolysehemmung (*in vitro*) und im Fiebertest (*in vivo*) Kreuzreaktionen zwischen Yersinia enterocolitica und Salmonella minnesota Lipid A gefunden.

Bei der Strukturaufklärung des Lipid A von Yersinia enterocolitica wurden zwei neue, die Lipid A-Analyse verbessernde und vereinfachende Methoden entwickelt. Anhand von Standardsubstanzen (α - und β -Formen von 1.3, 1.4 und 1.6 gebundenen Glukosamin-Disacchariden) wurde gefunden, daß permethylierte Glukosamin-Disaccharide einer gaschromatographischen Analyse zugänglich sind. Es war sogar möglich die Anomeren unterschiedlich verknüpfter Glukosamin-Disaccharide zu trennen. Die Art der interglykosidischen Bindung konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie ermittelt werden, da jedes Disaccharid durch spezifische Fragmente charakterisiert werden kann. Außerdem wurde gezeigt, daß auch Gemische von Zuckerphosphaten nach der Methylierung einer gaschromatographischen Trennung und massenspektrometrischen Analyse zugänglich sind.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	4
2.1. Lipopolysaccharide in der Bakterienzellwand	4
2.2. Biologische Charakterisierung des Lipopolysaccharides	5
2.3. Die chemische Struktur von Lipopolysacchariden	6
2.3.1. Die O-spezifische Seitenkette (Region I)	7
2.3.2. Das Kernoligosaccharid (Region II)	8
2.3.3. Der Lipoid A Teil (Region III)	8
2.4. Darstellung und Untersuchungsmethoden von Lipoid A	8
2.5. Die chemische Struktur der Lipoid A-Komponente	9
2.5.1. Das Lipoid A-Rückgrat	9
2.5.2. Substituenten des phosphorylierten Lipoid A-Grundgerüsts	10
2.5.3. Die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Lipoid A	11
2.5.4. Die vollständige Struktur des Lipoid A von <u>Salmonella minnesota</u>	13
2.5.5. Von <u>Salmonella</u> Lipoid A stark abweichende Lipoid A-Strukturen	14
2.6. Die Biosynthese von Lipoid A	15
2.7. Physikochemische Eigenschaften von Lipoid A und seine Funktion in der Zellwand	17
2.8. Die biologischen Wirkungen von Lipoid A	18
2.8.1. Die immunogenen Eigenschaften von Lipoid A	19
2.8.2. Kreuzreaktionen zwischen Lipoid A verschiedener Bakterien	20
2.8.2.1. Serologische Kreuzreaktionen (<u>in vitro</u>)	20
2.8.2.2. Pyrogentest auf Kreuzreaktionen (<u>in vivo</u>)	22
3. AUSGANGSPUNKT UND ZIEL DER ARBEIT	23
4. RESULTATE	24
4.1. CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	24
4.1.1. Untersuchung der Zuckerzusammensetzung von Lipopoly- sacchariden aus <u>Yersinia enterocolitica</u> 490 M, 75 R und 161-45a	24
4.1.2. Die chemische Zusammensetzung der Lipoid A-Komponente	25
4.1.3. Isolierung des Lipoid A-Rückgrats	26
4.1.3.1. Darstellung von LPS-OH	26
4.1.3.2. Darstellung von Lipoid A-OH	26
4.1.3.3. Isolierung des Glukosaminyl-Glukosaminitol-Disaccharides	26

	Seite
4.1.4.	Methylierungsanalyse des Lipoid A-Rückgrats 30
4.1.5.	Direkte GLC-MS-Analyse von permethylierten N-Acetyl- Glukosamin-Disacchariden 36
4.1.5.1.	Methylierung der reduzierten Glukosamin-Disaccharide und deren gaschromatographische Untersuchung 36
4.1.5.2.	Massenspektrometrische Analyse der reduzierten und permethylierten N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide 39
4.1.5.3.	Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse von nicht reduzierten Glukosamin-Disacchariden 48
4.1.5.4.	Anwendung der direkten GLC-MS-Analyse von Glukosamin- Disacchariden für die Untersuchung von Lipoid A 50
4.1.6.	<u>Diskussion der Kapitel 4.1.4. und 4.1.5.</u> 53
4.1.7.	Identifizierung des Glukosamin-Restes, der die estergebundene Phosphatgruppe trägt 57
4.1.8.	Bestimmung der genauen Position des estergebundenen Phosphates am nicht reduzierenden Glukosamin des Lipoid A-Grundgerüsts 61
4.1.8.1.	Untersuchung von Zuckerphosphaten mit Hilfe der GLC-MS-Analyse 61
4.1.8.1.1.	Gaschromatographische Analyse von Zuckerphosphaten 61
4.1.8.1.2.	Massenspektrometrische Analyse von Zuckerphosphaten 64
4.1.8.1.3.	<u>Diskussion der GLC-MS Analyse von Zuckerphosphaten</u> 67
4.1.8.2.	Isolierung des Lipoid A-Rückgrats mit estergebundenem Phosphat 68
4.1.8.3.	Methylierungsanalyse des Phosphoglukosaminyl- β-1.6-Glukosaminitol-Disaccharides 72
4.1.9.	Untersuchung von (phosphorylierten) Glukosamin-Disacchariden mit Hilfe des Aminosäureanalysators 74
4.1.10.	Bestimmung der Phosphat-Substituenten im Lipoid A-Grundgerüst 77
4.1.10.1.	Bestimmung des Substituenten der estergebundenen Phosphat-Gruppe 77
4.1.10.1.1.	Identifizierung von L-4-Aminoarabinose in <u>Yersinia</u> LPS 77
4.1.10.1.2.	Semiquantitative Bestimmung von L-4-Aminoarabinose 78
4.1.10.1.3.	Bestimmung der Bindungsstelle von L-4-Aminoarabinose am Lipoid A-Rückgrat 79
4.1.10.2.	Untersuchungen zur Frage ob der glykosidisch gebundene Phosphat- Rest einen Substituenten trägt 80

	Seite
4.1.11. Fettsäuren	81
4.1.11.1. Analyse der Gesamtfettsäuren	81
4.1.11.2. Analyse der ester gebundenen Fettsäuren	84
4.1.11.3. Isolierung des Lauroxymyristinsäuremethylesters	87
4.1.11.4. Analyse der amid gebundenen Fettsäuren	88
4.1.11.5. Bestimmung der absoluten Konfiguration der 3-Hydroxymyristinsäure	89
4.1.11.6. N- und O-Acetylbestimmung	90
4.2. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	91
4.2.1. Untersuchungen der Kreuzreaktion des LPS aus <u>Yersinia enterocolitica</u> 161-45a mit <u>Salmonella</u> Lipoid A	91
4.2.1.1. Test der passiven Hämolyse mit Lipoid A-OH aus <u>Yersinia enterocolitica</u> 161-45a	91
4.2.1.2. Test der Hämolysehemmung mit Lipoid A-OH aus <u>Yersinia enterocolitica</u> 161-45a	92
4.2.1.3. Untersuchung der spezifischen Absorption von Lipoid A-Antikörpern	92
4.2.1.4. Pyrogentest mit Kaninchen auf Lipoid A-Kreuzreaktionen	93
4.2.1.4.1. Bestimmung der MPD-3 von <u>Yersinia enterocolitica</u> LPS	93
4.2.1.4.2. Untersuchung auf Kreuzreaktion zwischen <u>Yersinia enterocolitica</u> und <u>Salmonella</u> Lipoid A mit dem Fiebertest	95
5. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	96
6. MATERIAL UND METHODEN	105
6.1. Züchtung der Bakterien und Gewinnung des LPS	105
6.2. Chemische Methoden	105
6.2.1. Präparative Methoden	105
6.2.1.1. Reduktion mit Natriumborhydrid	105
6.2.1.1.1. Milde Reduktion	105
6.2.1.1.2. Starke Reduktion	106
6.2.1.2. Hydrazinolyse	106
6.2.1.3. Acetylierung von Zuckern	106
6.2.1.3.1. N-Acetylierung der Aminos Zucker	106
6.2.1.3.2. Peracetylierung von Zuckern	107
6.2.1.4. Herstellung von Alditolacetaten für die gaschromatographische Untersuchung (nach Sawardecker)	107
6.2.1.5. Derivatisierung von 4-Amino-Arabinose zur semiquantitativen gaschromatographischen Bestimmung	107

6.2.1.6.	Isolierung des Lipoid A-Rückgrats	100
6.2.1.6.1.	Darstellung von LPS-OH	100
6.2.1.6.2.	Darstellung von Lipoid A-OH	100
6.2.1.6.3.	Darstellung des freien reduzierten Lipoid A-Rückgrats (Glukosamin-Disaccharid)	100
6.2.1.7.	Methylierung von Zuckern nach Hakomori	100
6.2.1.7.1.	Darstellung des Dimethylsulfinylcarbanions	100
6.2.1.7.2.	Methylierungsreaktion	100
6.2.1.8.	Methylierungsanalyse von Glukosamin-Disacchariden nach Stellner et al.	110
6.2.1.9.	Enzymatische Phosphatabspaltung mit Phosphomonoesterase	110
6.2.2.	<u>Kolorimetrische Bestimmungsmethoden</u>	110
6.2.2.1	Phosphat	110
6.2.2.1.1.	Gesamtposphat	110
6.2.2.1.2.	Anorganisches Phosphat	110
6.2.2.2.	Glukosamin (Morgan-Elson-Reaktion)	110
6.2.2.2.1.	Die direkte Morgan-Elson-Reaktion	110
6.2.2.2.2.	Effekte, welche die Chromogenbildung bei der Morgan-Elson-Reaktion beeinflussen	110
6.2.2.2.3.	Gesamtglukosamin (Morgan-Elson-Reaktion nach Hydrolyse)	110
6.2.2.3.	dOClA (3-deoxy-D-manno-octulonsäure = KDO)	110
6.2.2.3.1.	Methode nach Weissbach	110
6.2.2.3.2.	Methode nach Karkhanis	110
6.2.3.	<u>Qualitative und quantitative Fettsäureanalysen</u>	110
6.2.3.1.	Reagenzien	110
6.2.3.1.1.	0,5 N Natriummethylatlösung	110
6.2.3.1.2.	Ätherische Diazomethanlösung	110
6.2.3.2.	Methoden	110
6.2.3.2.1.	Zugabe des inneren Standards	110
6.2.3.2.2.	Ausschütteln der Fettsäuren mit Chloroform	110
6.2.3.2.3.	Herstellung der Fettsäuremethylester mit Diazomethan	110
6.2.3.2.4.	Herstellung von Methoxyfettsäuremethylester mit Diazomethan/ Bortrifluoriddiäthylätherat	110

	Seite
6.2.3.3.	Analyse der Gesamtfettsäuren 118
6.2.3.4.	Analyse der estergebundenen Fettsäuren 118
6.2.3.5.	Analyse der amidgebundenen Fettsäuren 119
6.2.3.6.	Bestimmung der absoluten Konfiguration der 3-Hydroxymyristinsäure 119
6.2.3.7.	Isolierung und Identifizierung des Substituenten an der estergebundenen 3-Hydroxyfettsäure 120
6.2.3.8.	Gesamtacetylbestimmung 120
6.2.3.9.	O-Acetylbestimmung 121
6.2.4.	<u>Chromatographische Methoden</u> 121
6.2.4.1.	Dünnschichtchromatographie zur Untersuchung von Zuckern 121
6.2.4.2.	Präparative Dünnschichtchromatographie zur Isolierung von 3-Methoxyfettsäuren 121
6.2.4.3.	Hochspannungspapierelektrophorese 122
6.2.4.4.	Der Aminosäureanalysator 123
6.2.4.5.	Gaschromatographie 124
6.2.5.	<u>Massenspektrometrische Untersuchungen</u> 125
6.3.	Biologische und serologische Untersuchungsmethoden 125
6.3.1.	<u>Pyrogentest (in vivo)</u> 125
6.3.1.1.	Tiere 125
6.3.1.2.	Pyrogene 125
6.3.1.3.	Art der Injektion und Temperaturmessung 125
6.3.2.	<u>Test der passiven Hämolyse (in vitro)</u> 126
6.3.2.1.	Antigen = alkalibehandeltes Lipoid A (Lipoid A-OH) 126
6.3.2.2.	Beladen der Erythrozyten mit Lipoid A-OH 126
6.3.2.3.	Antiseren 126
6.3.2.4.	Absorption von Lipoid A-Antiseren 127
6.3.2.5.	Meerschweinchenkomplement 127
6.3.2.6.	Bestimmung der Hämolyse in Hämagglutinations-Titerplatten 127
6.3.2.7.	Bestimmung der passiven Hämolysehemmung 127
	LITERATURVERZEICHNIS 129

Abkürzungen:

Ara	= Arabinose
AraN	= Arabinosamin
BSA	= Bovine Serum Albumin
dOctA	= 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid
Gal	= Galaktose
GalN	= Galaktosamin
Glc	= Glukose
GlcN _{Ac}	= N-Acetyl-Glukosamin
GlcN _{ol}	= Glukosaminitol
GLC-MS	= Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GlcN-GlcN _{ol}	= Glukosaminyl-Glukosaminitol-Disaccharid
Hep	= Heptose
LPS	= Lipopolysaccharid
MPD-3	= Minimal pyrogenic dose after 3 hours (Kleinste pyrogene Dosis 3 Stunden nach Injektion)
PCP	= Phenol, Chloroform, Petroläther
PETN	= Phosphoäthanolamin
P-GlcN-GlcN	= Phosphoglukosaminyl-Glukosamin-Disaccharid
P-GlcN-GlcN _{ol}	= Phosphoglukosaminyl-Glukosaminitol-Disaccharid

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel der Strukturaufklärung der Lipoid A-Komponente des Lipopolysaccharides dreier Yersinia enterocolitica Stämme durchgeführt.

Zur Untersuchung kam LPS aus einer Re-Mutante (Y.enterocolitica 161-45a) sowie aus zwei nicht klassifizierten R-Mutanten (75 R und 490 M). Es wurde gefunden, daß das Grundgerüst von Yersinia Lipoid A aus einem diphosphorylierten D-Glukosamin Disaccharid besteht. Dieses Lipoid A-Rückgrat wurde durch schrittweisen Abbau von LPS (Alkali, Säure, Reduktion, Hydrazinolyse) isoliert. Um die Position der interglykosidischen Bindung in diesem Disaccharid zu identifizieren wurde es einer Methylierungsanalyse nach Stellner unterworfen. Mit der kombinierten gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse der erhaltenen Alditolacetate wurde für das Rückgrat des Lipoid A aus Yersinia enterocolitica eine 1.6-Bindung zwischen den beiden Glukosamineinheiten ermittelt.

Da bei dem Acetolyseschritt der Methylierungsanalyse des Disaccharides durch O-Demethylierungen Artefakte gebildet wurden, die eine Interpretation der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analysenergebnisse erschwerten, wurde ein neuer Weg entwickelt, die Art der Verknüpfung der beiden Glukosamineinheiten zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß es möglich ist, methylierte Glukosamin-Disaccharide direkt (ohne vorherige Hydrolyse und weitere Derivatisierung) der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse zu unterwerfen. Als Standardpräparate wurden chemisch synthetisierte α - und β -Formen 1.3, 1.4 und 1.6 verknüpfter D-Glukosamin-Disaccharide untersucht. Die Ergebnisse mit diesen Vergleichssubstanzen zeigen, daß bei der gaschromatographischen Analyse das β -Isomere immer vor dem entsprechenden α Isomeren eluiert,

sodaß eine gute Trennung und somit auch Identifizierung der Anomeren möglich ist. Die Position der interglykosidischen Bindung der untersuchten Disaccharide konnte eindeutig mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt werden. Für jede Art der Verknüpfung ließen sich charakteristische Fragmente finden. Durch Anwendung der kombinierten gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse war es somit möglich, in einem Analysengang die anomere Konfiguration und die Position der interglykosidischen Bindung von Glukosamin-Disacchariden zu bestimmen.

Für das Rückgrat von Lipid A aus allen drei untersuchten Yersinia enterocolitica Stämmen wurde mit dieser neu entwickelten Methode eine β -1.6-Bindung ermittelt.

Quantitative Analysen ergaben, daß das Glukosamin-Disaccharid am C-Atom 1 des reduzierenden Glukosamin-Restes einen unsubstituierten Phosphatrest in glykosidischer Bindung trägt, und an der nicht reduzierenden Glukosamin-Gruppe einen Phosphatrest in Esterbindung besitzt, welcher teilweise (30%) mit L-4-Aminoarabinose substituiert ist.

Bei dem Versuch die genaue Position dieses estergebundenen Phosphates am Lipid A-Grundgerüst zu bestimmen, stellte sich heraus, daß Zuckerphosphate mit der Methode nach Hakomori methyliert und gaschromatographisch gut getrennt werden können. Anhand von Standard-Substanzen (Glukosamin-6-Phosphat, Glukose-6-Phosphat, Heptose-7-Phosphat) wurde deshalb die Fragmentierung von permethylierten Zuckerphosphaten im Massenspektrographen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Position des Phosphatrestes durch charakteristische Fragmente zu bestimmen ist.

Mit den Kenntnissen der Fragmentierung von permethylierten Glukosamin-Disacchariden einerseits und der von Glukosamin-Phosphaten andererseits konnte das reduzierte Lipid A-Rückgrat mit estergebundenem Phosphatrest massenspektrometrisch analysiert werden. Aus den Fragmenten ist

eindeutig zu erkennen, daß ein 1.6-gebundenes Phosphoglukosaminyl-Glukosaminitol Disaccharid vorliegt. Dabei deutet alles darauf hin, daß der Phosphatrest in Position 4 an das nicht reduzierende Glukosamin gebunden ist. Für eine sichere Bestimmung dieser Position wären aber noch Fragmentierungsstudien an bisher nicht erhältlichem Glukosamin-4-Phosphat und -3-Phosphat nötig.

Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung von Yersinia enterocolitica Lipoid A ergab, daß beide Aminogruppen des Rückgrats quantitativ mit D-3-Hydroxymyristinsäureresten besetzt sind. In Esterbindung liegen D-3-Hydroxymyristinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure und wenig Palmitinsäure vor. Die estergebundenen D-3-Hydroxymyristinsäure ist zu etwa 30-50% über ihre Hydroxylgruppe mit Laurinsäure verestert. Dieser D-3-Lauroxymyristinsäureester ist bisher ausschließlich bei Yersinia enterocolitica gefunden worden.

Die bei Yersinia enterocolitica aufgefundene Struktur ist ähnlich derjenigen von Salmonella und der anderer gram negativer Bakterien. Diese strukturelle Verwandtschaft spiegelt sich auch in serologischen Kreuzreaktionen wider. So ließ sich mit Hilfe von Lipoid A-Antiserum (Salmonella) im Test der passiven Hämolyse und im Fiebertest an Kaninchen eine Kreuzreaktion zwischen der Lipoid A-Komponente von Yersinia und Salmonella nachweisen.

2. EINLEITUNG

2.1. Lipopolysaccharide in der Bakterienzellwand

Lipoid A ist ein Bestandteil von Lipopolysacchariden (LPS, Endotoxin), welche aus zwei Teilstrukturen bestehen: Einem komplexen hydrophilen Heteropolysaccharid und dem daran kovalent gebundenen hydrophoben Lipoid (Lipoid A). Lipopolysaccharide kommen in der äußeren Membran der Zellwand gram negativer Bakterien vor (119).

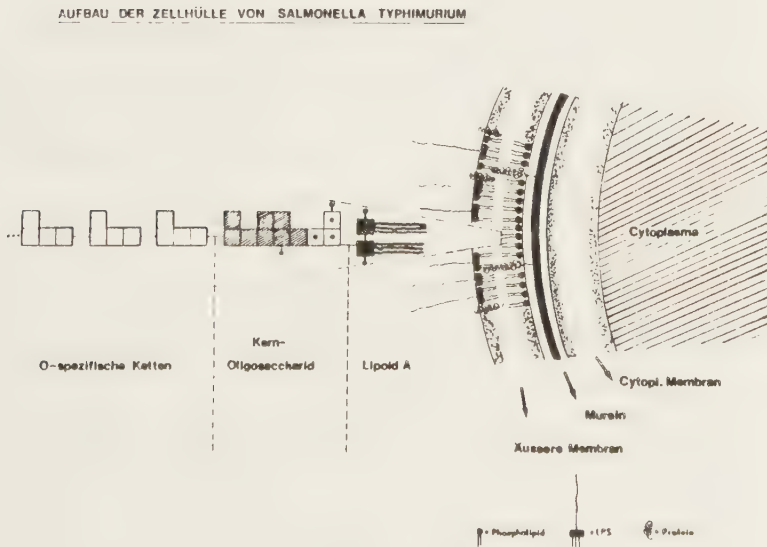


Abb. 1: Schematische Darstellung der Lage von LPS in der bakteriellen Zellwand.

Die Zellwand der Bakterien ist der Cytoplasmamembran nach außen vorge-lagert. Bei den gram positiven Bakterien ist sie eine homogene Schicht, die hauptsächlich aus einem dreidimensionalen mehrschichtigen Mureinnetz besteht. Bei den gram negativen Bakterien dagegen unterteilt sich die Zellwand in die innere Schicht, welche aus einem zweidimensionalen dünnen Murein-netz besteht, und in die äußere Schicht, die den biologischen Membranen sehr ähnlich ist und aus Phospholipiden, Proteinen und Lipopolysacchariden besteht (Abb. 1).

Die Mureinschicht trägt wesentlich zur mechanischen Stabilität der Zelle bei, während die äußere Membran als Permeationsbarriere dient. Das Lipopoly-saccharid ist mit seinem lipophilen Teil, dem Lipoid A, in der Bilayer der äußeren Membran verankert, wobei es noch eine laterale Mobilität aufweist (81,82). Der hydrophile Teil, die Polysaccharidkette, ragt dabei in das umgebende Medium. Auf Grund dieser exponierten Lage spielen die Lipopoly-saccharide während einer Infektion eine entscheidende Rolle bei den Wechsel-wirkungen zwischen Bakterien und Wirtsorganismen (25,26,74,103).

2.2. Biologische Charakterisierung des Lipopolysaccharides

Wie serologische und biologische Untersuchungen gezeigt haben, ist der Polysaccharidteil Träger der serologischen O-Spezifität (71,72). Die Immuni-sierung höherer Organismen mit LPS oder Bakterien führt zur Produktion von Antikörpern, die gegen den Polysaccharidteil der Lipopolysaccharide ge-richtet sind. Die endotoxischen Eigenschaften des LPS-Moleküles sind da-gegen an den Lipoid A-Teil gebunden (26,28,133). Eine Applikation von Lipoid A (oder LPS) führt im höheren Organismus zu einer Reihe von pathophysio-logischen Effekten wie Fieber oder Hypothermie (35,36,102), Komplement-aktivierung (18,21), Veränderungen im weißen Blutbild und zum tödlichen Schock. Das Lipoid A besitzt eine hohe Affinität zu Zellmembranen, Pro-

teinen und Lipiden. Man nimmt an, daß diese Eigenschaft die biologischen Aktivitäten dieses Moleküles bedingt.

Wegen der Vielzahl ihrer Effekte und wegen der Bedeutung der Endotoxine bei Infektionskrankheiten sind die Lipopolysaccharide Gegenstand intensiver chemischer, biologischer und medizinisch-biologischer Untersuchungen geworden.

2.3. Die chemische Struktur von Lipopolysacchariden

Alle Lipopolysaccharide sind Makromoleküle, die nach einem einheitlichen Bauprinzip gestaltet sind. Sie bestehen aus einem lipophilen Teil, dem Lipid A (Region III), und einer hydrophilen Polysaccharidkette. Letztere läßt sich wiederum strukturell und auf Grund ihrer Biosynthese in zwei Regionen unterteilen: Die O-spezifische Seitenkette (Region I) und das Kern-Oligosaccharid (Region II) (Abb. 2).

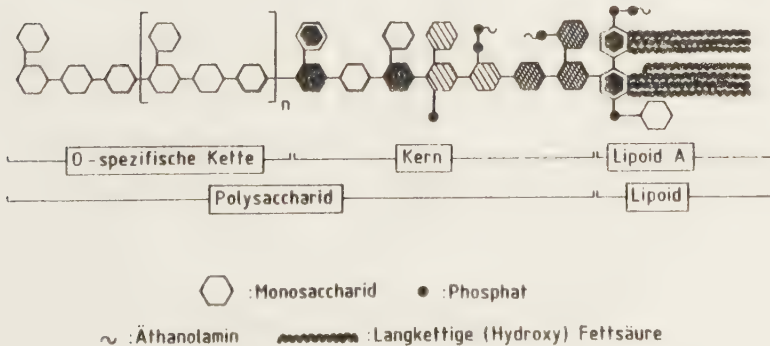


Abb. 2: Schematische Struktur eines Salmonella-Lipopolysaccharides modifiziert nach Rietschel (1978), unveröffentlicht.

2.3.1. Die O-spezifische Kette (Region I)

Die O-spezifische Kette ist der variable Teil des Moleküles. Er besteht aus sich wiederholenden Untereinheiten desselben Oligosaccharides, dessen Struktur und chemische Zusammensetzung bei den verschiedenen Spezies einer Gattung variieren. Hierdurch ist die serologische Vielfalt der Lipopolysaccharid-Antigene gegeben (54,71,72).

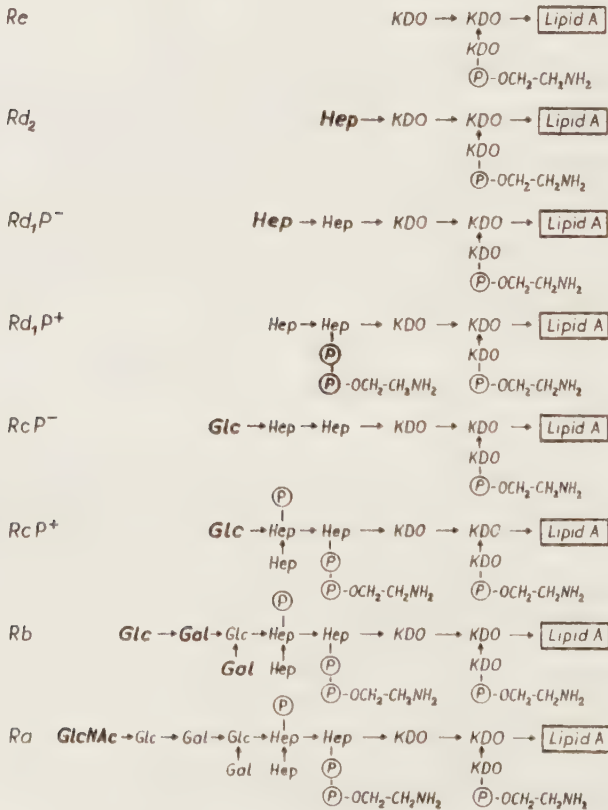


Abb. 3: Struktur von kerndefekten LPSs aus *Salmonella* R-Mutanten (Lüderitz et al. 1971)

2.3.2. Das Kernoligosaccharid (Region II)

Das Kernoligosaccharid ist im Vergleich zur O-spezifischen Seitenkette von weitaus geringerer Variabilität und innerhalb der Enterobacteriaceen-Familien analog aufgebaut. Es besteht im allgemeinen aus einem Hexose-Pentasaccharid und einem Heptose-deoxy-Oktulonsäure-Oligosaccharid. Über die Deoxy-Oktulonsäure (dOcIA) ist es an Lipoid A gebunden.

Neben den ursprünglichen Wild-(S)-Formen sind Mutanten (R-Formen) mit unvollständiger Polysaccharidkette bekannt. Sie entstehen spontan oder durch mutagene Behandlung und zeichnen sich durch die Abwesenheit der O-spezifischen Seitenkette aus (Ra-Form). Aber auch Defekte in der Biosynthese des Kern-Oligosaccharides kommen vor. Je nachdem an welcher Stelle der Biosynthese ein Block eingetreten ist, bezeichnet man diese Mutanten mit Rb, Rc, Rd und Re (Abb. 3).

Bei Re-Mutanten besteht das LPS also nur aus Lipoid A und drei dOcIA-Einheiten.

2.3.3. Der Lipoid A Teil (Region III)

Der Lipoid A-Teil der Lipopolysaccharide weist die geringste Variabilität auf. Er besteht im allgemeinen aus einem phosphorylierten β -1,6-gebundenen Glukosamin-Disaccharid, mit dem langkettige Fettsäuren in Ester- und Amidbindung verknüpft sind (Abb. 5). Dadurch erhält, dieser Teil des Moleküls seinen hydrophoben Charakter.

2.4. Darstellung und Untersuchungsmethoden von Lipoid A

Lipoid A erhält man durch milde saure Hydrolyse von S- und R-Form LPS. Die sehr säurelabile Bindung zwischen dOcIA und Lipoid A wird dabei gespalten, und das freie Lipoid A, ohne Polysaccharidkette, präzipitiert als

wasserunlösliches Produkt aus. Die Analyse der Lipoid A Bausteine ergab, daß es aus Glukosamin, Phosphat und Fettsäuren besteht. In manchen Fällen wurden noch 4-Amino-Arabinose, Äthanolamin, Arabinose oder zusätzlich Glukosamin gefunden (Tab. 1).

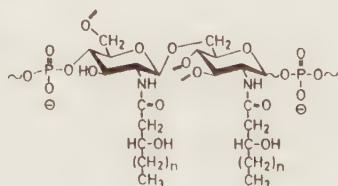
Verschiedene Abbauege (mit Hydrazin, Alkali und Säure) wurden entwickelt (30,41), um in Kombination mit der Methylierungsanalyse die Struktur des phosphorylierten Lipoid A-Grundgerüsts bestimmen zu können.

2.5. Die chemische Struktur der Lipoid A-Komponente (74,104)

2.5.1. Das Lipoid A-Rückgrat

Lipoid A-Präparate aus verschiedenen Gruppen von Bakterien weisen eine gleiche Grundstruktur auf. Sie enthalten ein β -1,6 gebundenes Glukosamin-Disaccharid, das sogenannte Lipoid A-Rückgrat. Dieses trägt zwei Phosphatreste, einen am C-Atom 1 in glycosidischer Bindung und einen weiteren am C-Atom 4 des nicht reduzierenden Glukosamins in Esterbindung (Abb. 4). Dieses Lipoid A-Grundgerüst ist bei den meisten der bisher untersuchten Endotoxine gefunden worden (28,30,41,74,104).

1	<i>Salmonella</i> spp	S, Re
1	<i>Escherichia coli</i>	S, Ra, Re
1, 2	<i>Shigella flexneri</i> (sonnei)	S, Re
3	<i>Serratia marcescens</i>	S
1	<i>Proteus mirabilis</i> *	S, Re
1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	S, Re
4	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	S
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S
1	<i>Xanthomonas sinensis</i>	S
1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	S
1	<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>	S
5	<i>Rhodospirillum tenue</i>	S
1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	S
6	<i>Selenomonas ruminantium</i>	S
7	<i>Aeromonas liquefaciens</i>	S
1	<i>Rhizobium trifolii</i>	S



1 RIETSCHEL et al., 2 ROMANOWSKA,
3 ADAMS, 4 WILKINSON, 5 MAYER et al.,
6 TAKAHASHI, 7 SHAW

Abb. 4: Bakterien, die ein phosphoryliertes Glukosamin-Disaccharid als Lipoid A-Grundgerüst besitzen.

* Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

2.5.2. Substituenten des phosphorylierten Lipoid A-Grundgerüsts

An dieses phosphorylierte Glukosamin-Disaccharid können verschiedene Substituenten geknüpft sein. Der estergebundene Phosphatrest trägt oft 4-Aminarabinose (43,124,126,138). Das glycosidisch gebundene Phosphat kann mit Phosphoäthanolamin (Salmonella, 83), D-Glukosamin (Chromobacterium violaceum, 43) oder D-Arabinose (Rhodospirillum tenue, 124) quantitativ oder partiell substituiert sein (Tab. 1).

Tabelle 1: Art der Substituenten an den Phosphatgruppen des Lipoid A-Grundgerüsts

Lipoid A	Substituent der Phosphat-Gruppe am	
	C-4'	C-1
Escherichia coli	-	(Phosphat)
Yersinia enterocolitica *	L-4-AraN (30%)	-
Proteus mirabilis	L-4-AraN	-
Salmonella	L-4-AraN	PETN (30%)
Chromobacterium violaceum	L-4-AraN	D-GlcN
Rhodospirillum tenue **	L-4-AraN	D-Ara

* Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

** Trägt zusätzlich am C-Atom 4 einen Glukosamin-Rest.

Im Falle von Rhodospirillum tenue ist noch ein dritter Substituent des Lipoid A-Rückgrats gefunden worden, der jedoch nicht über einen Phosphatrest gebunden ist. Am C-Atom 4 des reduzierenden Glukosamins befindet sich in diesem Fall ein weiterer Glukosamin-Rest.

2.5.3. Die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Lipoid A

Die beiden Aminogruppen des Glukosamin-Disaccharides sind immer quantitativ mit 3-Hydroxyfettsäuren substituiert, deren Kettenlänge zwischen C₁₀ und C₁₈ variiert (Tab. 2).

Tabelle 2: Amidgebundene Fettsäuren verschiedener Lipoid A.

<u>Bakterien</u>	<u>N-Acyl-Rest</u>
Rhodospirillum tenue	D-3-OH-10:0
Rhodopseudomonas gelatinosa	
Pseudomonas aeruginosa	D-3-OH-12:0
Chromobacterium violaceum	
Escherichia coli	D-3-OH-14:0
Salmonella spp	
Shigella flexneri	
Klebsiella pneumoniae	
Enterobacter aerogenes	
Proteus mirabilis	
Yersinia enterocolitica *	
Fusobacterium nucleatum	D-3-OH-16:0
Rhizobium trifolii	D-3-OH-16:0
	D-3-OH-18:0
Xanthomonas sinensis	D-3-OH-12:0
	D-3-OH-11-Me-12:0
Myxococcus fulvus	3-OH-16:0
	3-OH-15-Me-16:0

* Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

Wie aus der vorliegenden Arbeit geschlossen werden kann und auch aus anderen Ergebnissen unseres Arbeitskreises hervorgeht (135), befindet sich in manchen Fällen an der Hydroxylgruppe dieser amidgebundenen Fettsäuren noch ein Substituent, dessen Natur noch unbekannt ist. Wahrscheinlich

handelt es sich um eine Fettsäure.

Am C-Atom 3 des nicht reduzierenden Glukosamins hat das Lipoid A seine Bindungsstelle zur Polysaccharidkette. Die nun noch verbleibenden drei Hydroxylgruppen des Lipoid A-Rückgrats sind mit Fettsäuren verestert. Diese ester gebundenen Fettsäuren variieren in ihrer Zusammensetzung am meisten. Es kommen gerad- oder ungeradzahlige Fettsäuren vor, sowie unverzweigte und verzweigte, nicht hydroxylierte und L-2-Hydroxy- und D-3-Hydroxyfettsäuren mit Kettenlängen zwischen C_{10} und C_{18} (101,107).

Tabelle 3: Lipoid A, welche 3-Acyloxyacyl-estergruppen enthalten

<u>BAKTERIEN</u>	<u>3-ACYLOXYACYL-GRUPPE</u>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$ \begin{array}{l} \downarrow \text{--L-2-OH-12:0} \\ \text{D-3-O} \text{-----} 10:0 \\ \uparrow \text{-----16:0} \end{array} $
<i>Vibrio parahemolyticus</i> <i>Vibrio metchnikovii</i>	$ \begin{array}{l} \downarrow \text{-----} 12:0 \\ \text{D-3-O} \text{-----} 12:0 \end{array} $
<i>Vibrio cholerae</i>	$ \begin{array}{l} \downarrow \text{D-3-OH-12:0} \\ \text{D-3-O} \text{-----} 12:0 \end{array} $
<u><i>Yersinia enterocolitica</i></u> *	$ \begin{array}{l} \downarrow \text{-----} 12:0 \\ \text{D-3-O} \text{-----} 14:0 \end{array} $
<i>Salmonella</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	$ \begin{array}{l} \downarrow \text{(L-2-OH-) 14:0} \\ \text{D-3-O} \text{-----} 14:0 \end{array} $

* Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

** Das Lipoid A von Chromobacterium violaceum enthält keinen Diester.

Bei einigen Bakterien sind die estergebundenen 3-Hydroxyfettsäuren über ihre Hydroxygruppe mit einer weiteren Fettsäure verbunden (Tab. 3). Diese Acyloxyacyl ester wurden entweder indirekt aufgrund der Bildung von Artefakten (3-Methoxyfettsäuren, ungesättigte Fettsäuren) oder direkt durch Isolierung der Acyloxyacylreste erkannt.

2.5.4. Die Struktur des Lipoid A von Salmonella minnesota

Da das Lipoid A von Salmonella minnesota bisher am genauesten untersucht worden ist, soll es hier als Beispiel für eine vollständige Lipoid A-Struktur gram negativer Bakterien gezeigt werden (Abb. 5).

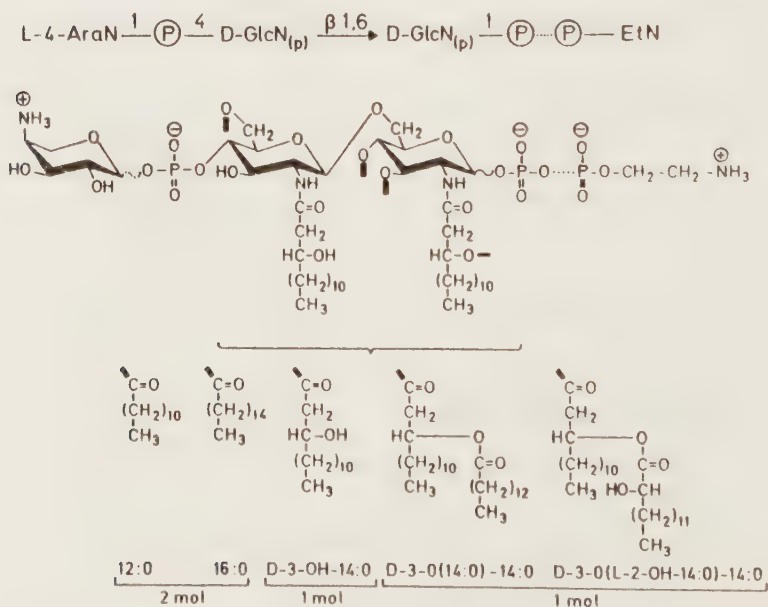


Abb. 5: Struktur des Lipoid A von Salmonella minnesota

Das estergebundene Phosphat ist zu etwa 30% mit 4-Aminoarabinose (127) besetzt. Der glycosidisch gebundene Phosphatrest trägt Phosphoäthanolamin (ca. 30%, 83). Zwei Mol 3-Hydroxymyristinsäure sind amidgebunden. Laurin-, Palmitin- und 3-Hydroxymyristinsäure liegen in Esterbindung vor. In diesem Fall ist die Hydroxylgruppe der estergebundenen 3-Hydroxysäure mit Myristin- und in kleinen Mengen mit L-2-Hydroxymyristinsäure besetzt (101).

Bis auf kleine Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung und bei den Substituenten an den Phosphatresten (Tab. 1), weisen die Lipid A-Komponenten der gram negativen Bakterien E.coli (11,41), Proteus mirabilis (138), Xanthomonas sinensis (41), Shigella (41), Fusobacterium nucleatum (41) und Chromobacterium violaceum (43) eine mit Salmonella verwandte Struktur auf (Abb. 4).

2.5.5. Von Salmonella Lipid A stark abweichende Lipid A-Strukturen

Das Lipid A von Rhodopseudomonas viridis (Rh.palustris) besitzt eine vollkommen andere Lipid A-Struktur (110,129). An Stelle von Glukosamin wurde ein 2,3-di-amino-2,3-di-deoxy-D-Glukosemolekül isoliert, das in Amidbindung 3-Hydroxymyristinsäure trägt (Abb. 6).

Dieselbe Diaminohexose besitzt nach neuen Analysen von Wilkinson (134,141) auch das Lipid A von Pseudomonas diminuta (Ps.vesicularis).

Auch aus der blaugrünen Alge Anabena variabilis konnte LPS isoliert werden. Dieses enthält aber kein Phosphat, woraus zu schließen ist, daß die Lipid-Komponente dieses LPS denen der Enterobacteriaceen nicht sehr ähnlich ist. Genaue Untersuchungen sind aber noch nicht durchgeführt worden (128).

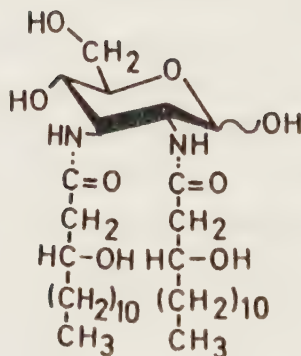
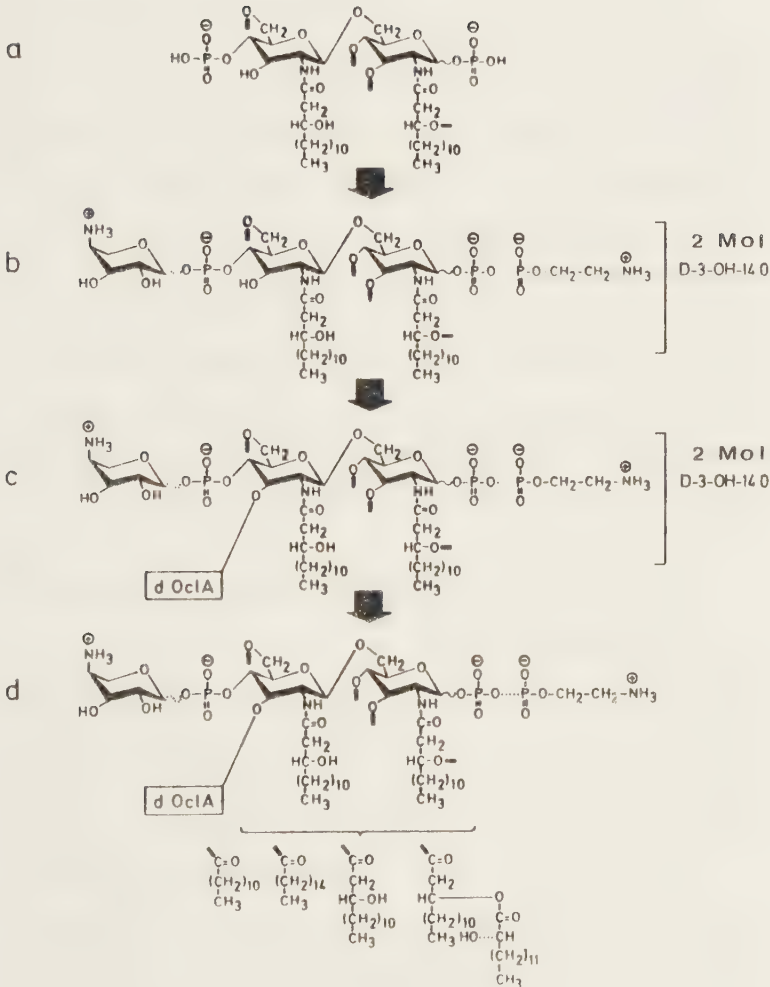


Abb. 6: Chemische Struktur des Lipoid A aus Rhodopseudomonas viridis.

2.6. Die Biosynthese von Lipoid A

Über die Biosynthese der Polysaccharidkette ist durch Untersuchungen von Mutanten mit verschiedenen Defekten im Enzymsystem schon viel bekannt (90). Aber erst die Isolierung von Mutanten, welche unter bestimmten Bedingungen einen Block in der dOcIA Biosynthese aufweisen (66), ermöglichte einen ersten Einblick in die Biosynthese der Lipoid A-dOcIA Region. Diese Mutanten kumulieren auffallender Weise kein vollständiges Lipoid A. So konnten zwei verschiedene Lipoid A Vorstufen isoliert werden (64,65,66). a) Ein "saurer Precursor", bestehend aus einem diphosphorylierten Glukosamin-Disaccharid (Lipoid A-Rückgrat), das mit 4 Mol 3-Hydroxymyristinsäure substituiert ist, und b) ein "neutraler Precursor", bei dem die beiden Phosphatgruppen mit 4-Aminarabinose und Phosphoäthanolamin besetzt sind (Abb. 7).



Interessanter Weise werden an diese beiden Vorstufen zunächst die dOclA-Moleküle geknüpft, also ein Teil der Core-Region, bevor das Lipoid A mit den restlichen Fettsäuren vervollständigt wird (67). Die beiden polaren Gruppen 4-Aminoarabinose und Phosphoäthanolamin werden bei der Biosynthese von Lipoid A offensichtlich vor dem dOclA eingebaut. Sie sind aber keine notwendige Voraussetzung für die Knüpfung der dOclA Bindung, denn es existieren vollständige LPS-Strukturen, bei denen die Phosphatgruppen im Lipoid A unbesetzt sind.

Nach Untersuchungen von Munson et al. (84) wird zunächst ein 2-4 gebundenes dOclA-Disaccharid an den sauren Precursor geknüpft. Man nimmt an, daß dann zunächst die restlichen nicht hydroxylierten Fettsäuren zugefügt werden, bevor die Biosynthese der Core-Region abgeschlossen wird. Genaue Untersuchungen darüber liegen aber noch nicht vor.

2.7. Physikochemische Eigenschaften von Lipoid A und seine Funktion in der Zellwand

Lipoid A ist, ähnlich wie die Phospholipide, ein amphipathisches Molekül. Das phosphorylierte Glukosamin-Disaccharid mit 4-Aminoarabinose und Phosphoäthanolamin als Substituenten stellt den hydrophilen Teil des Moleküles dar. Die daran gebundenen langkettigen Fettsäuren verleihen dem Lipoid A seinen lipophilen Charakter (Abb. 2). In wässrigem Medium ist Lipoid A unlöslich. Die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} sowie Polyamine trägt zur Aggregation bei. Galanos entwickelte mit der Elektrodialyse (24) eine Methode, die Kationen zu entfernen, und damit die Möglichkeit, LPS oder Lipoid A durch Neutralisation mit Alkali in eine definierte lösliche Form zu bringen. Lipoid A kann auch durch Komplexbildung mit Rinderserumalbumin (BSA, 21,22,25) oder durch Zugabe von Triäthylamin in Lösung gebracht werden.

Über das Lipoid A-Molekül ist das LPS in der äußeren Membran der Bakterienzellwand verankert (Abb. 1). Die ursprüngliche Annahme, daß die LPS-Moleküle in der Membran durch Pyrophosphatbrücken zwischen den Lipoid A-Einheiten untereinander verbunden seien (75), ist inzwischen durch Mühlradt et al. (83) widerlegt worden. Es sind wahrscheinlich nur ionische und hydrophobe Wechselwirkungen, die das Molekül in der Membran halten oder zu den Aggregationen von isoliertem LPS führen.

Nikaido hat gezeigt, daß die äußere Membran asymmetrisch aufgebaut ist (87). Demnach befinden sich Phospholipide nur auf der Innenseite der Membran, während die Außenseite ausschließlich von Lipoid A-Molekülen gebildet wird, von denen die Polysaccharidketten in das umgebende Medium ragen (Abb. 1). Darauf beruht die geringe Permeabilität für hydrophobe Verbindungen. Vergleiche auch Ames (4).

2.8. Die biologischen Wirkungen von Lipoid A

Schon 1954 postulierten Westphal und Lüderitz (133), daß die endotoxischen Eigenschaften der Lipopolysaccharide im Lipoid A vereinigt seien. Aber erst durch die Isolierung von Re-Mutanten wurde es möglich, diese These experimentell zu bestätigen, denn dieses unvollständige LPS, das nur Lipoid A und dOclA (Abb. 3) enthält, besitzt alle biologischen Wirkungen von intaktem Endotoxin (57,72,88).

Später zeigte Galanos, daß dies auch für freies Lipoid A zutrifft, sobald es in löslicher Form vorliegt (nach Elektrodialyse, oder als BSA-Komplex 25). Damit ist klar, daß die Polysaccharidkette nur serologische Bedeutung besitzt, für die pathophysiologischen Effekte aber das Lipoid A allein verantwortlich ist (22,25,28,73,74,100,103).

Lösliches Lipoid A ist stark toxisch für Mäuse, erzeugt bei Kaninchen Fieber (102), aktiviert das Komplementsystem (23) und zeigt auch alle anderen biologischen Aktivitäten, die durch vollständiges LPS verursacht werden (Tab. 4).

Tabelle 4: Biologische Aktivitäten von freiem Lipoid A
 (nach Galanos, 28)

Pyrogenität (23,102)
Letale Toxizität bei Mäusen (23)
Leukopenie (Galanos und Westphal, unveröffentl. Ergeb.)
Leukocytose (Galanos und Westphal, unveröffentl. Ergeb.)
Lokale Shwartzman Reaktion (Galanos unveröffentl. Ergeb.)
Knochenmarksnekrose (23,137)
Komplementaktivierung (21)
Blutdrucksenkung (131)
Aktivierung des Hagemann-Faktors (80)
Induktion des Plasminogen-Aktivators (34)
Induktion einer unspezifischen Resistenz gegen Infektionen (91)
Induktion von Toleranz gegen Endotoxin-Wirkungen (102)
Adjuvans-Aktivität (7)
Mitogene Wirkung auf B-Lymphozyten (6,10,46,95,111)
Aktivierung von Makrophagen (3)
Induktion des "Colony stimulating factor" (8)
Induktion der IgG-Synthese bei neugeborenen Mäusen (59)
Induktion der Prostaglandin-Synthese (14,139,140)
Induktion der Pyruvat-Kinase in der Mäuseleber (120)
Inhibition der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (45)
Hypothermie bei Mäusen (35,36)

2.8.1. Die immunogenen Eigenschaften von Lipoid A

Wie oben beschrieben, wird das LPS-Molekül durch Lipoid A in der Zellwand gram negativer Bakterien verankert. Dadurch ist Lipoid A stark abgeschirmt, sodaß lange Zeit seine immunogenen Eigenschaften nicht erkannt wurden. Tatsächlich werden aber nicht nur Antikörper gegen die O-spezifische Seitenkette gebildet, sondern auch gegen Lipoid A, wenn es für Lymphozyten erreichbar ist.

Galanos fand, daß die Immunisierung mit unveränderten Salmonella R 595 Bakterien, welche Re-Lipopolysaccharid besitzen, nur sehr wenig Antikörper gegen Lipoid A hervorruft. Wenn man aber durch saure Hydrolyse das KDO entfernt, sodaß sich freies Lipoid A in der Bakterienzellwand befindet, wird der Titer von Anti-Lipoid A-Antikörpern schon wesentlich höher. Die besten Ergebnisse erzielt man aber, wenn die mit Säure behandelten Bakterien noch zusätzlich mit freiem Lipoid A beladen wurden (Abb. 8). Anti-Lipoid A-Antikörper können z.B. mit dem Test der passiven Hämolysen von Lipoid A beladenen Erythrozyten bestimmt werden (22) (Siehe auch 6.3.2.).

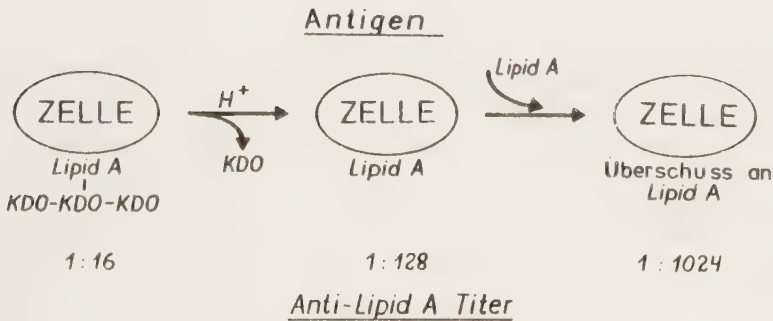


Abb. 8: Herstellung von immunogenem Lipoid A. Aufarbeitung von Re-Mutanten und die Titer der Anti-Lipoid A-Antikörper nach Immunisierung mit unveränderten, säurebehandelten und Lipoid A-beladenen Zellen (Nach Galanos, 25).

2.8.2. Kreuzreaktionen zwischen Lipoid A verschiedener Bakterien

2.8.2.1. Serologische Kreuzreaktion in vitro

Der passive Hämolysen-Test kann auch verwendet werden, um Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Lipoid A zu untersuchen. Dazu werden die

Erythrozyten mit dem zu testenden Lipoid A beladen und der Hämolysetiter mit z.B. Anti-Salmonella Lipoid A-Antiserum bestimmt. Die Ergebnisse solcher Versuche sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Serologische Kreuzreaktionen von Lipoid A verschiedener gram negativer Bakterien mit Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum (nach Galanos, 28).

Organismus	Kreuzreaktion
<u>Salmonella</u>	+
<u>Escherichia coli</u>	+
<u>Shigella flexneri</u>	+
<u>Proteus mirabilis</u>	+
<u>Proteus vulgaris</u>	+
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	+
<u>Yersinia enterocolitica</u>	+
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	+
<u>Xanthomonas sinensis</u>	+
<u>Vibrio cholerae</u>	+
<u>Rhodopseudomonas gelatinosa</u>	+
<u>Rhodopseudomonas viridis</u>	-
<u>Rhodopseudomonas palustris</u>	-
<u>Rhodospirillum tenue</u>	+
<u>Chromobacterium violaceum</u>	+
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	+
<u>Rickettsia canada</u>	+
<u>Rickettsia prowazekii</u>	+
<u>Coxiella burnetii</u> (Phase I)	+

Danach bestehen Kreuzreaktionen zwischen Salmonella Lipoid A und dem vieler anderer Bakterien. Die einzige Ausnahme bilden Rhodopseudomonas viridis und palustris, deren Lipoid A auch in seiner Grundstruktur stark von dem der Enterobacteriaceen abweicht (Abb. 6).

Bisher wissen wir noch nicht, welche Lipoid A-Struktur die Antigendeterminanten darstellen. Sicherlich ist das Glukosamin-Disaccharid mit einer amid-gebundenen Fettsäure beteiligt, da es als Hapten wirksam ist (47). So zeigte z.B. auch der "saure Lipoid A Precursor" (Abb. 7) serologische Kreuzreaktion mit freiem Salmonella Lipoid A (26).

2.8.2.2. Pyrogentest auf Kreuzreaktionen (in vivo)

Der Nachteil am Test der passiven Hämolysen für Lipoid A-Kreuzreaktionen liegt darin, daß er nur mit freiem Lipoid A durchgeführt werden kann. Bei der Herstellung von freiem Lipoid A durch saure Hydrolyse werden aber unter Umständen säure-labile Substituenten des Lipoid A abgespalten. Rietschel untersuchte deshalb die Reaktionen von LPS (welches intaktes Lipoid A enthält) mit Lipoid A-Antiserum (100,102). Er studierte die pyrogene Aktivität von LPS in Kaninchen und deren Unterdrückung mit Lipoid A-Antisera. So konnte er zeigen, daß Lipoid A-Antiserum nur einen Schutz vor Lipoid A induziertem Fieber bewirkt, wenn die Kaninchen mit einer Dosis Lipoid A oder LPS vorbehandelt waren. Warum diese Vorbehandlung nötig ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Mit dem Pyrogentest konnte gezeigt werden, daß LPS-Präparationen von E.coli und Shigella flexneri mit Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum kreuzreagieren. Andererseits zeigen LPS von Chromobacterium violaceum und Rhodospirillum tenue keine Kreuzreaktion. Da aber mit dem freien Lipoid A dieser Bakterien Kreuzreaktionen festgestellt wurden, nimmt man an, daß die Substituenten an den Phosphatgruppen (Tab. 1), welche im freien Lipoid A abgespalten sind, die determinanten Strukturen von Lipoid A im kompletten LPS blockieren (74,106).

Diese wenigen Beispiele lassen erkennen, daß die Vielzahl der biologischen Aktivitäten von Lipoid A mit verschiedenen Teilstrukturen des Moleküles gekoppelt ist. Um die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität besser erkennen zu können, müssen aber noch mehr Strukturanalysen und biologische Untersuchungen durchgeführt werden.

3. ANGANGSPUNKT UND ZIEL DER ARBEIT

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, besteht das Grundgerüst der Lipoid A-Komponente verschiedener bakterieller Lipopolysaccharide aus einem phosphorylierten Glukosamin-Disaccharid, welches mit ester- und amidgebundenen Fettsäuren substituiert ist. Unterschiede sind vor allem in der Fettsäurezusammensetzung und in verschiedener Substitution der Phosphatgruppen zu finden. Bearbeitet waren vor allem die untereinander sehr ähnlichen Lipoid A Strukturen der Enterobacteriaceen Salmonella, E.coli und Shigella und die davon mehr oder weniger stark abweichenden Strukturen von Chromobacterium und Rhodopseudomonas. In der vorliegenden Arbeit habe ich Untersuchungen an Yersinia Lipoid A durchgeführt.

Erst die genaue und vollständige Kenntnis vieler Lipoid A-Strukturen wird eine chemische Systematik der Lipoid A-Komponenten ermöglichen, die für taxonomische und evolutionäre Betrachtungen von Bedeutung wäre. Außerdem ist eine detaillierte Kenntnis der Feinstruktur von Lipoid A nötig, um Einblick in die Strukturen und Gruppen zu bekommen, die diesem Molekül seine biologischen (endotoxischen) Eigenschaften verleihen.

Die Strukturaufklärung von Yersinia Lipoid A ist in diesem Rahmen ein Beitrag zur besseren Kenntnis der enterobakteriellen Endotoxine. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Analysenwege und Methoden weitmöglichst zu vereinfachen, um eine systematische Aufklärung anderer Lipoid A-Strukturen gram negativer Bakterien zu ermöglichen.

4. RESULTATE

4.1. CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.1.1. Untersuchung der Zuckerzusammensetzung von Lipopolysacchariden aus Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a

Für die geplante Untersuchung von Lipoid A aus Yersinia standen aus dem Institut für klinische Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg drei Bakterienstämme zur Verfügung, von denen einer als Re-Mutante klassifiziert worden war. Um dies zu überprüfen, wurde aus den drei zu untersuchenden Stämmen Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a nach der PCP-Methode (20) Lipopolysaccharid (LPS) extrahiert und mit Hilfe dünnschicht- und gaschromatographischer Methoden auf die Zuckerzusammensetzung hin untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Zuckerzusammensetzung des LPS der drei Bakterienstämme Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a.

Lipopolysaccharid	dOclA	Hept	Gal	Glc	GalN	GlcN
Yers. ent. 490 M	+	+	+	+	(+)	+
Yers. ent. 75 R	+	+	-	+	-	+
Yers. ent. 161-45a	+	-	-	-	-	+

Der Stamm 490 M besitzt neben dOclA noch Heptose, Galaktose, Glukose und Spuren von Galaktosamin. Der Stamm 75 R weist neben dOclA noch Heptose und Glukose auf, während der Stamm 161-45a außer dOclA keine weiteren Zucker in der Seitenkette besitzt. Diese Ergebnisse zeigen, daß es sich bei dem Stamm 161-45a wie erwartet um eine Re-Mutante handelt, deren LPS nur aus dOclA und Lipoid A besteht.

4.1.2. Die chemische Zusammensetzung der Lipoid A-Komponente

Das Lipoid A der bisher untersuchten gram negativen Bakterien besteht aus einem Glukosamin-Disaccharid, das je mit einem ester- und einem glykosidisch gebundenen Phosphat, zwei amidgebundenen und mehreren estergebundenen Fettsäuren substituiert ist. Das Bindeglied zwischen dem Lipoid A und dem Polysaccharidteil stellt das dOcIA dar. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, ob das Lipoid A von Yersinia enterocolitica in diese Reihe mit einzuordnen sei, wurden quantitative Bestimmungen von dOcIA, Phosphat, Glukosamin und Fettsäuren durchgeführt. Dazu wurde intaktes LPS benutzt, da durch jegliche Form der Hydrolyse Substituenten abgespalten werden und damit verloren gehen könnten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Lipoid A-Komponente verschiedener Yersinia enterocolitica Stämme

Lipopolysaccharid	dOcIA	Phosphat	GlcN	Fettsäuren
$\mu\text{Mol/mg (Mol/2 Mol GlcN)}$				
490 M	0,21 (0.7)	0.40 (1.5)	0.52 (2.0)	1.2 (4.1)
75 R	0,40 (1.6)	0.63 (2.5)	0.50 (2.0)	1.1 (4.4)
161-45a	0.65 (1.6)	1.06 (2.7)	0.81 (2.0)	1.3 (3.5)

In Annäherung kann man sagen, daß in allen drei untersuchten Yersinia enterocolitica Stämmen pro 2 Mol Glukosamin 2-3 Mol Phosphat und 4-5 Mol Fettsäuren im Lipoid A vorhanden sind.

4.1.3. Isolierung des Lipoid A-Rückgrats

Um genauere Informationen über den Aufbau von Yersinia Lipoid A zu erhalten, wurden die drei LPS Präparate nach dem Abbauschema von Hase und Rietschel (41) (Abb. 9) stufenweise von bestimmten Substituenten befreit und die einzelnen Zwischenstufen untersucht. Dieser Abbau erfolgte analog zu Salmonella Lipoid A über LPS-OH und Lipoid A-OH bis zur Isolierung des Lipoid A-Rückgrats, einem β 1,6-gebundenen Glukosamin-Disaccharid.

4.1.3.1. Darstellung von LPS-OH

LPS-OH wurde durch milde alkalische Hydrolyse von LPS hergestellt (Siehe 6.2.1.6.1.), wobei die estergebundenen Fettsäuren abgespalten wurden.

4.1.3.2. Darstellung von Lipoid A-OH

Milde saure Hydrolyse von LPS-OH (siehe 6.2.1.6.2.) spaltete den am C-Atom 1 gebundenen Phosphatrest und dOClA ab, wobei das Glukosamin-Disaccharid mit zwei amidgebundenen Fettsäuren und dem estergebundenen Phosphat präzipitierte.

4.1.3.3. Isolierung des Glukosaminyl-Glukosaminitol Disaccharides

Lipoid A-OH wurde bei 57°C mit Natriumborhydrid reduziert (siehe 6.2.1.1.2.) und anschließend für 40 Stunden einer Hydrazinolyse unterworfen (siehe 6.2.1.2.), um die estergebundene Phosphatgruppe und die amidgebundenen Fettsäuren abzuspalten. Durch Hochspannungspapierelektrophorese (siehe 6.2.4.3.) wurde das Glukosamin-Disaccharid ($M_{\text{GlcN}} = 1,12$) von anderen Produkten wie Glukosamin(itol) oder Zuckerphosphaten abgetrennt. Die chemische Analyse der bei diesen Abbaureaktionen gewonnenen Fraktionen ist in Tabelle 8 zusammengestellt und soll im Folgenden am Beispiel des LPS aus der Re-Mutante (161-45a) besprochen werden.

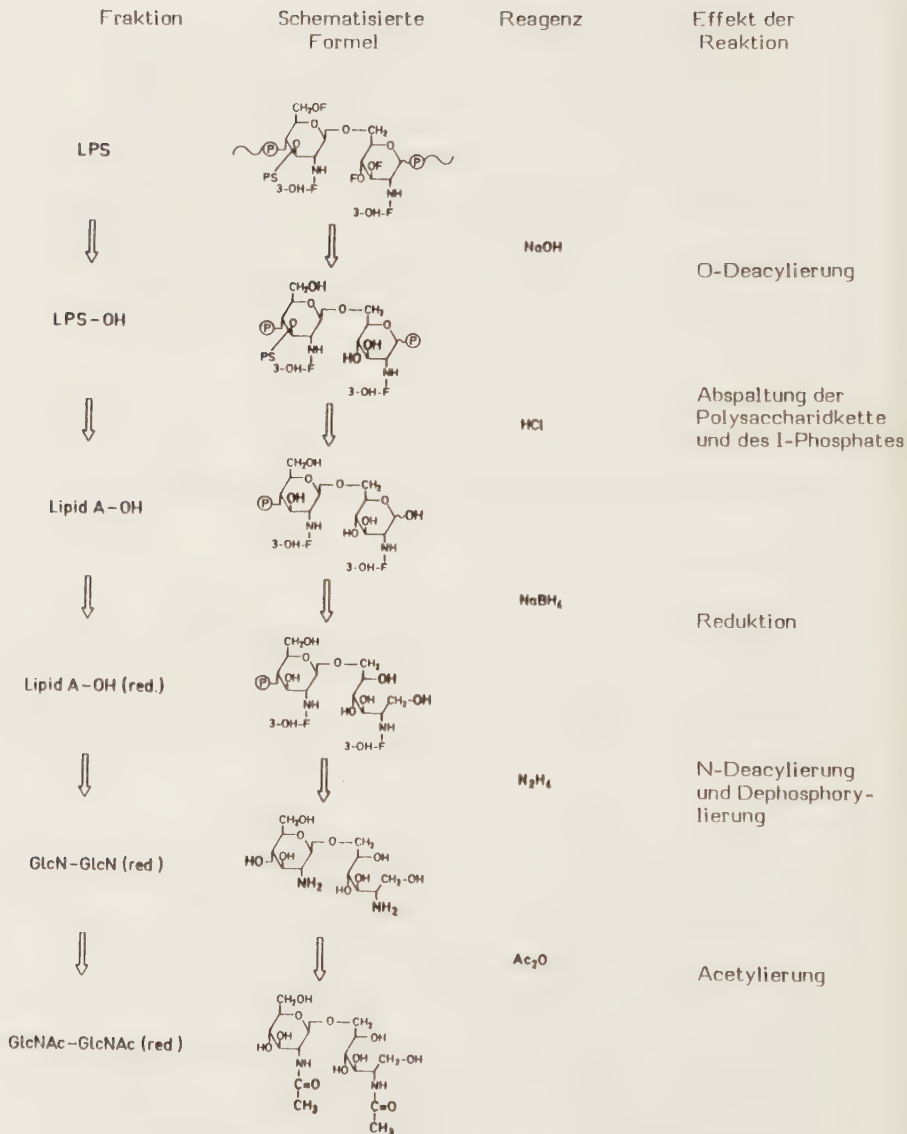


Abb. 9: Schematisierter Abbauweg vom LPS zum Lipid A Rückgrat analog *Salmonella* Lipid A (nach Hase und Rietschel, 41). Dargestellt ist die chemische Struktur der einzelnen Fraktionen und die entsprechende Reaktion, welche zu diesen Fraktionen führt.

Tabelle 8: Chemische Analyse der Abbauprodukte von Yersinia enterocolitica LPS. Die Ausbeute ist bezogen auf die vorhergehende Fraktion (= 100%).
n.b. = nicht bestimmt.

Fraktion	Ausbeute	dOclA	Phosphat	Glukosamin, bestimmt mit der Morgan-Elson Reaktion		Glukosamin-phosphat	Glukosamin	Glukosaminitol
				ohne Hydrolyse	mit Hydrolyse *			
bestimmt mit dem * Aminosäureanalysator								
%								
Mol/2 Mol Glukosamin								
<u>Yers. ent. 490 M</u>								
Unbehandeltes LPS	-	0,70	1,48	-----	2,00	0,32	0,93	---
LPS-OH	60	0,81	1,42	-----	2,00	0,25	1,25	---
Lipoid A-OH	31	--	0,61	0,97	2,00	0,19	1,62	---
Lipoid A-OH red.	57	--	0,57	-----	1,00	0,18	0,78	0,81
Disaccharid	11	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	----	1,00	0,95
<u>Yers. ent. 75 R</u>								
Unbehandeltes LPS	-	1,60	2,52	-----	2,00	0,24	2,19	---
LPS-OH	70	1,65	2,19	-----	2,00	n.b.	n.b.	n.b.
Lipoid A-OH	22	--	0,73	0,99	2,00	0,31	2,13	---
Lipoid A-OH red.	60	--	0,62	-----	1,00	0,14	0,83	0,92
Disaccharid	10	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	----	1,00	0,81
<u>Yers. ent. 161-45a</u>								
Unbehandeltes LPS	-	1,64	1,65	-----	2,00	0,28	1,85	---
LPS-OH	77	1,65	1,51	-----	2,00	n.b.	n.b.	n.b.
Lipoid A-OH	27	--	0,97	0,82	2,00	0,41	1,59	---
Lipoid A-OH red.	44	--	0,94	-----	1,00	0,49	0,55	1,08
Disaccharid	13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	----	1,00	0,94

* Alle Proben nach 10-stündiger Hydrolyse mit 4 N HCl bei 100°C

Durch Behandlung von LPS mit Alkali wurde die Fraktion LPS-OH erhalten (Ausbeute 77%), die in ihrer chemischen Zusammensetzung (GlcN, P, dOclA) dem intakten LPS sehr ähnlich war. Fraktion LPS-OH war jedoch weitgehend frei von estergebundenen Fettsäuren. Die Behandlung von LPS-OH mit Salzsäure ergab die Fraktion Lipoid A-OH (Ausbeute 27%) die frei von dOclA war. Der Gehalt an organischem Phosphat war in Fraktion Lipoid A-OH (0.97 Mol/2 Mol GlcN) um etwa 40% niedriger als in Fraktion LPS-OH (1.52 Mol/2 Mol GlcN). Im Einklang hiermit konnte im Hydrolysat P_i nachgewiesen werden (0.72 Mol/2 Mol GlcN). Da in Fraktion Lipoid A-OH die Farbausbeute im direkten Morgan-Elson-Test (siehe 6.2.2.2.) angenähert 1 Mol/2 Mol GlcN betrug, konnte angenommen werden, daß bei der Überführung von LPS-OH in Lipoid A-OH der Phosphatrest am C-Atom 1 abgespalten worden war. Reduktion von Lipoid A-OH führte zu einem Präparat das keine Farbreaktion beim direkten Morgan-Elson-Test lieferte und in dem etwa äquimolare Mengen von GlcN zu GlcNol (1.0/1.1 Mol/Mol) vorlagen. Dieser Befund deutete an, daß im Yersinia Lipoid A ein Glukosamin-Disaccharid vorliegt. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, daß nach Hydrazinolyse bei hochspannungspapieroelektrophoretischer Auftrennung mit Ninhydrin eine Fraktion nachgewiesen werden konnte, die einen identischen Migrationswert ($M_{\text{GlcN}} = 1.1$) wie authentisches Chitobiitol ($M_{\text{GlcN}} = 1.1$) aufwies. Die chemische Analyse der wie Chitobiitol wandernden Fraktion zeigte, daß es sich dabei um ein reduziertes Disaccharid handelte. Auffallend bei der hochspannungspapieroelektrophoretischen Auftrennung war allerdings das Auftauchen von Glukosaminitol ($M_{\text{GlcN}} = 1.00$). Offensichtlich wurde bei der schwach sauren Hydrolyse zur Lipoid A-OH Herstellung doch schon die Bindung zwischen den Glukosamineinheiten des Lipoid A-Rückgrats gespalten. Bei der anschließenden Reduktion entstand dann Glukosaminitol. Wie aus Tabelle 8 zu erkennen ist, verhalten sich alle drei Mutanten beim Abbau von LPS zum Lipoid A ähnlich.

4.1.4. Methylierungsanalyse des Lipid A-Rückgrats

Um die Position der Bindung zwischen den beiden Glukosamineinheiten des Lipid A-Rückgrats von Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a zu bestimmen, wurde mit allen dreien eine Methylierungsanalyse nach Stellner et al. (122) durchgeführt. Dazu wird das isolierte Glukosaminyl-Glukosaminitol-Disaccharid N-acetyliert (siehe 6.2.1.3.1.), nach Hakomori methyliert (siehe 6.2.1.7.) und einer Acetylolyse, gefolgt von Reduktion und Peracetylierung (siehe 6.2.1.8.), unterworfen. Wie von Hase und Rietschel beschrieben (40,41), erhält man bei der gaschromatographischen Untersuchung (ECNSS-M, 170°C) drei Hauptpeaks mit den Retentionszeiten $t_R = 0.43, 1.00$ und 1.10 (bezogen auf den Standard 3.4.6.-tri-O-methyl-1.5-di-O-acetyl-2-deoxy-2(N-methylacetamido)-glucitol, $t_R = 1.00$). Nach der Methylierungsanalyse des Lipid A-Rückgrats von Yersinia enterocolitica erschien aber noch ein vierter Peak mit der Retentionszeit $t_R = 1.40$ (Abb. 10).

Die Massenspektren dieser vier Peaks (aus Abb. 10) sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

Das Massenspektrum von Peak 1 (Abb. 11 A) zeigt charakteristische Fragmente bei $m/e = 88$ (130-42), 130, 174, 161, 117, 218, 290 und 258 (290-32). Diese Ionen zeigen, daß die zu Peak 1 korrelierende Verbindung identisch ist mit 1.3.4.5.-tetra-O-methyl-6-O-acetyl-2-deoxy-2(N-methyl-acetamido)-glucitol.

Die Retentionszeit und die charakteristischen Fragmente $m/e = 116$ (158-42), 158, 202, 205, 161 und 117 von Peak 2 (Abb. 11 B) sind identisch mit denen des Standards. Dieser Peak repräsentiert daher 3.4.6.-tri-methyl- 1.5-di-O-acetyl-2-deoxy-2(N-methylacetamido)-glucitol.

Peak 3 (Abb. 11 C) zeichnet sich durch die Fragmente bei $m/e = 116$ (158-42), 158, 202, 246, 161 und 117 aus. Wie Hase und Rietschel (40) vorschlagen,

repräsentiert dieser Peak 1.3.4.5.-tetra-O-methyl-6-O-acetyl-2-deoxy-2(N-acetylacetamido)-glucitol. Sie postulierten, daß bei der Methylierung von N-acetyl-Glukosaminitol eine Methylacetamidatgruppe entsteht, welche

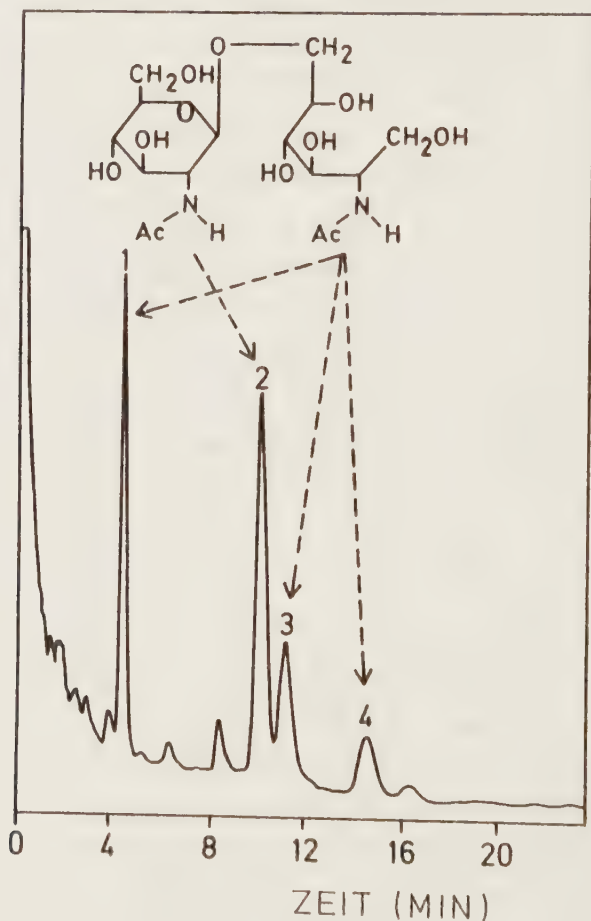


Abb. 10: Gaschromatogramm des N-acetylierten, permethylierten Lipid A-Rückgrats von *Yersinia enterocolitica* nach der vollständigen Methylierungsanalyse.

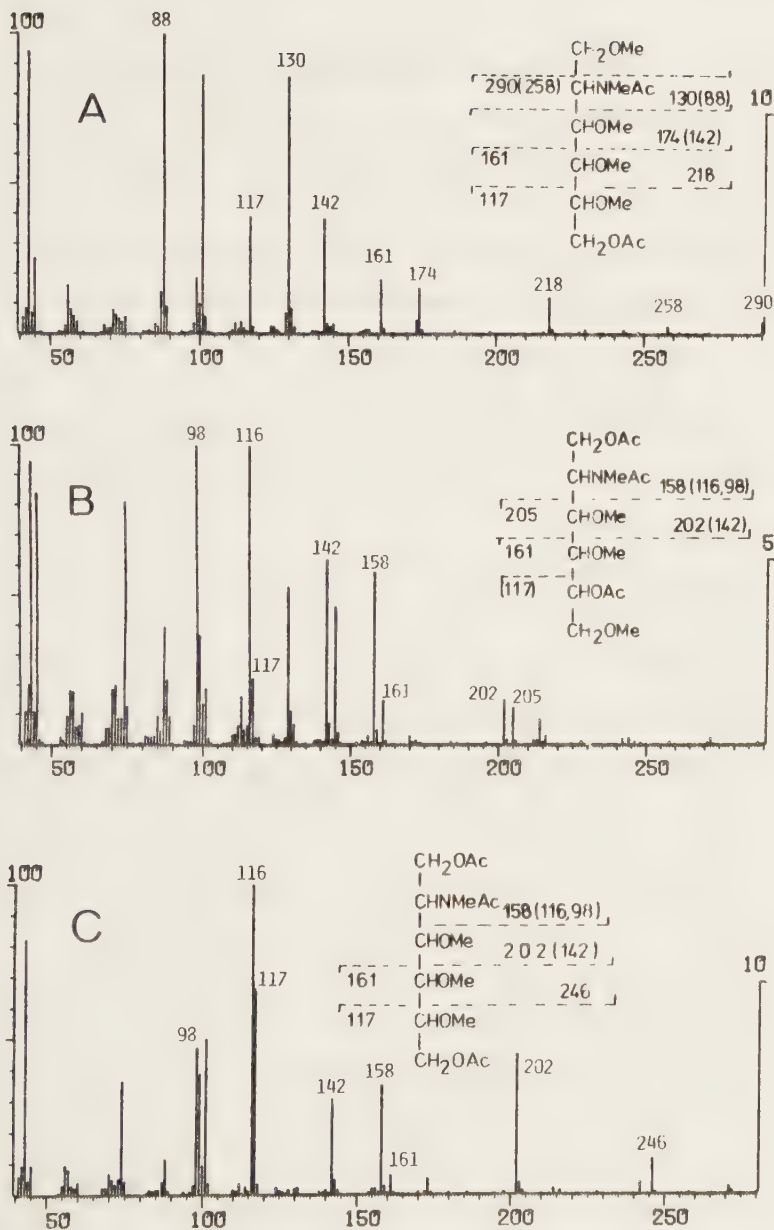


Abb. 11: Massenspektren der methylierten und acetylierten Glukosamin-derivate aus der Methylierungsanalyse des Lipoid A-Rückgrats von *Yersinia enterocolitica*
 A = Spektrum von Peak 1 in Abb. 10, B = Spektrum von Peak 2 in Abb. 10 und C = Spektrum von Peak 3 in Abb. 10.

während der Acetolyse abgespalten wird. Man nahm an, daß die Methoxygruppen in Position 1 und 3 die Aminfunktion in Position 2 so stark nukleophil machen, daß bei der Peracetylierung eine Acetylacetamidogruppe gebildet wird.

Kürzlich fanden Caroff und Szabo allerdings (12), daß bei dem Acetolyse-schritt, der zur Spaltung der glykosidischen Bindung führt, eine O-Demethylierung am C-Atom 1 des Glukosaminolteiles stattfindet. Diese Autoren zeigten, daß bei der anschließenden Acetylierung ein 1-O-acetyl-2-(N-methylacetamido)-2-deoxy-hexitolderivat entsteht und nicht, wie von Hase und Rietschel postuliert, ein 1-O-methyl-2-(N-acetylacetamido)-2-deoxy-hexitolderivat.

Auffallend im Massenspektrum von Peak 3 ist die Tatsache, daß ein Fragment $m/e = 98$ relativ intensiv vorhanden ist, während dies in dem entsprechenden Massenspektrum in der Publikation von Hase und Rietschel (40) nicht vorkommt. Dies Fragment könnte aus dem Ion $m/e = 158$ nach Abspaltung von Essigsäure ($MG = 60$) entstehen. Dies spräche für eine O-Acetylgruppe am C-Atom 1, da eine N-Acetylgruppe als Keten ($MG = 42$), aber nicht als Essigsäure abgespalten wird. Auf Grund dieser Befunde kann man annehmen, daß die dem Peak 3 entsprechende Verbindung identisch ist mit 3,4,5.-tri-O-methyl-1,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2(N-methylacetamido)-glucitol.

Peak 4: Nach der Methylierungsanalyse des Lipoid A-Rückgrates von Yersinia enterocolitica erschien im Gaschromatogramm noch ein vierter Peak mit einer Retentionszeit von $t_R = 1.4$. Das Massenspektrum dieses vierten Peaks (Abb. 12) zeigt charakteristische Fragmente bei $m/e = 88$ (130-42), 130, 161, 117, 246 und 318. Durch das Fehlen der Massen 174, 218 und 258 unterscheidet sich dieses Spektrum von dem aus Peak 1. Neu sind dafür die Fragmente 170, 246 und 318. Die Tatsache, daß das Fragment 45 klein und das Fragment 117 relativ stark anwesend ist, läßt auf eine Acetylgruppe in

der Position 6 schließen. Die Anwesenheit der Fragmente 117 und 161 zeigt, daß die Positionen 5 und 4 methyliert sind. Aus den Fragmenten bei $m/e = 130$ und 88 ist zu erkennen, daß die Position 1 methyliert ist und sich am C-Atom 2 eine N-Methyl-Acetamido-Gruppe befindet. Wegen des Auftretens der Fragmente bei $m/e = 318$ und 246 muß außer den Acetylgruppen am Stickstoff und am C-Atom 6 noch eine dritte Acetylgruppe im Molekül vorhanden sein.

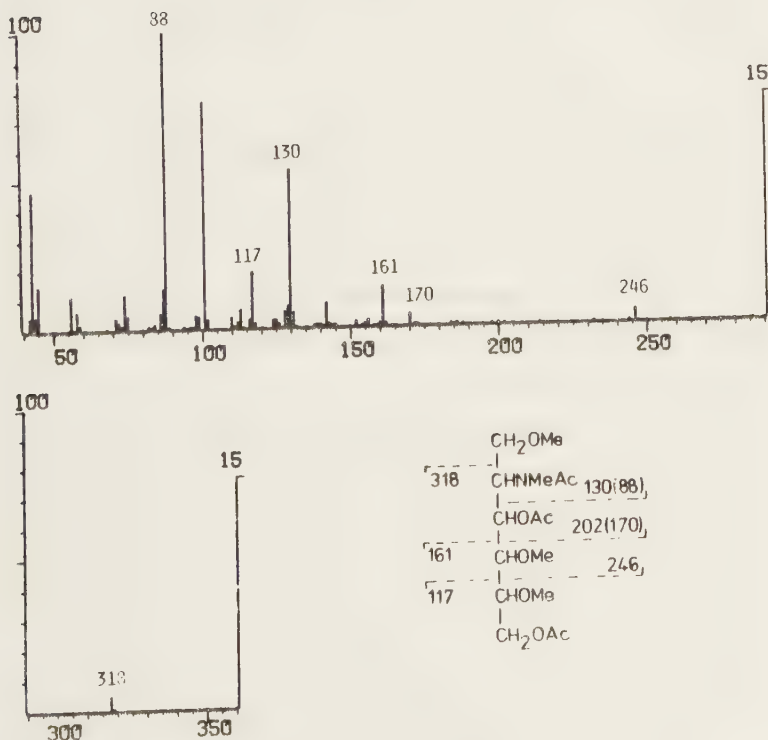


Abb. 12: Massenspektrum von Peak 4 in Abb. 10

Diese kann sich nur am C-Atom 3 befinden. Daraus ergibt sich, daß Peak 4 dem 1.4.5.-tri-O-methyl-3.6-di-O-acetyl-2-deoxy-2(N-methylacetamido)-glucitol entspricht. Es ist bisher leider noch nicht möglich gewesen, aufzuklären, ob für das Auftreten der Acetylgruppe in der Position 3 ein Substituent verantwortlich ist, der während der Acetolyse abgespalten wird, oder ob auch hier nur eine O-Demethylierung stattgefunden hat, Peak 4 also ein Artefakt darstellt.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate trotz der Artefakte eindeutig, daß die beiden Glukosamineinheiten im Lipoid A von Yersinia enterocolitica 1.6 gebunden sind.

Wie man aus der Stellung der Acetylgruppe am C-Atom 5 ersehen kann, stammt nur Peak 2 vom nicht reduzierenden Glukosamin des Lipoid A-Rückgrats. Die Peaks 1, 3 und 4 sind 6-O-acetyliert, also aus dem Glukosaminanteil des Disaccharides entstanden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Interpretation der Gaschromatogramme und Massenspektren nach einer vollständigen Methylierungsanalyse von Glukosamin-Disacchariden kompliziert und nicht sehr eindeutig ist.

Da Kärkkäinen (51) und Mononen et al. (78) permethylierte Disaccharide aus Neutralzuckern oder einem Neutral- und einem Aminozucker gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht haben, lag es nahe, die Möglichkeiten für eine direkte Analyse des Lipoid A-Rückgrats und anderer Glukosamin-Disaccharide ohne Hydrolyse zu erproben.

4.1.5. Direkte GLC-MS-Analyse von permethylierten N-Acetyl-Glukosamin-Disacchariden

Untersucht wurden die α - und β -Isomeren der 1.3, 1.4 und 1.6 gebundenen Glukosamin-Disaccharide. Peracetyliertes D-Glukosaminyl- β -1.6-D-Glukosamin wurde nach der Methode von Hase und Rietschel (siehe 6.2.1.6. und 41) aus dem LPS einer Salmonella Re-Mutante hergestellt. N-Acetyl-D-Glukosaminyl- β -1.4-N-Acetyl-D-Glukosamin (Chitobiose) und Maltotriose (Innerer Standard) waren kommerzielle Produkte. Die peracetylierten α -1.3, β -1.3, α -1.4 und α -1.6 gebundenen Glukosamin-Disaccharide stellte Professor H. Paulsen/Hamburg (92,93,94) zur Verfügung.

4.1.5.1. Methylierung der reduzierten Glukosamin-Disaccharide und deren gaschromatographische Untersuchung

Die peracetylierten Glukosamin-Disaccharide (1-2 mg) wurden mit Natriumborhydrid oder Natriumbordeuterid bei Raumtemperatur de-O-acetyliert und reduziert (siehe 6.2.1.1.1.). Die anschließende Methylierung erfolgte nach der Methode von Hakomori (siehe 6.2.1.7.). Nach Reinigung über eine Sephadex LH-20 Säule wurden die reduzierten und permethylierten N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide direkt gaschromatographisch untersucht (SE-30, 10%, 270°C). Zunächst wurde gefunden, daß sich die anomeren Formen der untersuchten Disaccharide gut gaschromatographisch voneinander trennen lassen (Tabelle 9), wobei die β -Form der 1.3, 1.4 und 1.6 gebundenen Disaccharide eine kleinere Retentionszeit als die α -Form besitzt. Die α - und β -Isomeren des 1.6 gebundenen Disaccharides eluieren wesentlich später als die der 1.3 und 1.4 verknüpften Glukosamin-Reste (Tabelle 9). Dagegen besitzen die β -1.3 und β -1.4 gebundenen einerseits und die α -1.3* und α -1.4

* Ein α -1.3-N-Acetyl-Galaktosamin-Disaccharid ($t_R = 0.922$), das zum Vergleich untersucht wurde, ließ sich unter den angegebenen Bedingungen vom Isomeren Glukosamin-Disaccharid ($t_R = 0.86$) gut trennen.

gebundenen Disaccharide andererseits gleiche Retentionszeiten (Abb. 13). Dies ist auch der Fall, wenn andere stationäre Phasen (OV-17, OV-225, QF-1) verwendet werden. Sogar auf Kapillarsäulen (Dexil 410, SE 54) ist keine Trennung der 1.3 von den 1.4 verknüpften Disacchariden möglich. In Tabelle 9

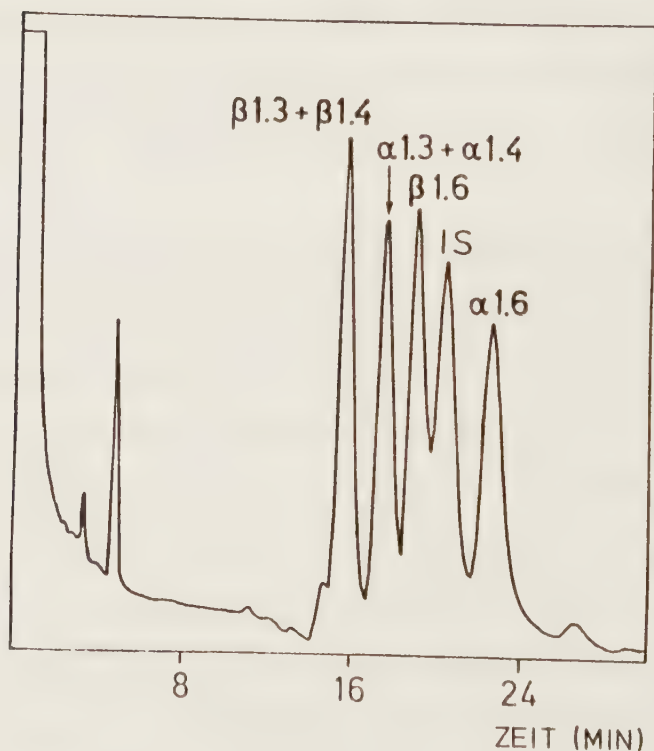


Abb. 13: Gaschromatogramme von permethylierten N-Acetyl-Glukosamin-Disacchariden SE-30, 10%, 270°C). Die Peaks entsprechen β -1.3 + β -1.4, α -1.3 + α -1.4, β -1.6 und α -1.6 gebundenem Glukosamin-Disaccharid. Peak IS entspricht permethyliertem Maltotriitol (Innerer Standard). Der Peak, welcher nach etwa 5 Minuten von der Säule eluiert, wird durch Phthalsäureverunreinigung hervorgerufen.

Tabelle 9: Relative Retentionszeiten der α - und β -Formen von permethylierten N-Acetylglukosaminyl-N-Acetylglukosaminidol Disacchariden, so wie sie auf verschiedenen stationären Phasen erhalten werden.
Die relativen Retentionszeiten beziehen sich auf permethyliertes Maltotriitol ($t_R = 1.00$)

Permethyliertes reduziertes N-Acetyl-D-Glukosamin- Disaccharid Art der Bindung	Relative Retentionszeiten			
	Stationäre Phase und Temperatur (°C)			
	SE-30 (270°C)	OV-17 (270°C)	OV-225 (260°C)	QF-1 (260°C)
α 1.3 ¹	0.86	0.89	2.40	3.62
β 1.3	0.76	0.69	nb ²	nb ²
α 1.4	0.85	0.88	2.33	3.58
β 1.4	0.77	0.71	1.96	3.26
α 1.6	1.11	1.21	3.48	5.34
β 1.6	0.93	1.00	2.66	3.94

¹ t_R von α 1.3 gebundenem N-Acetyl-D-Galaktosamin Disaccharid = 0.92 (SE-30).

² nb = nicht bestimmt.

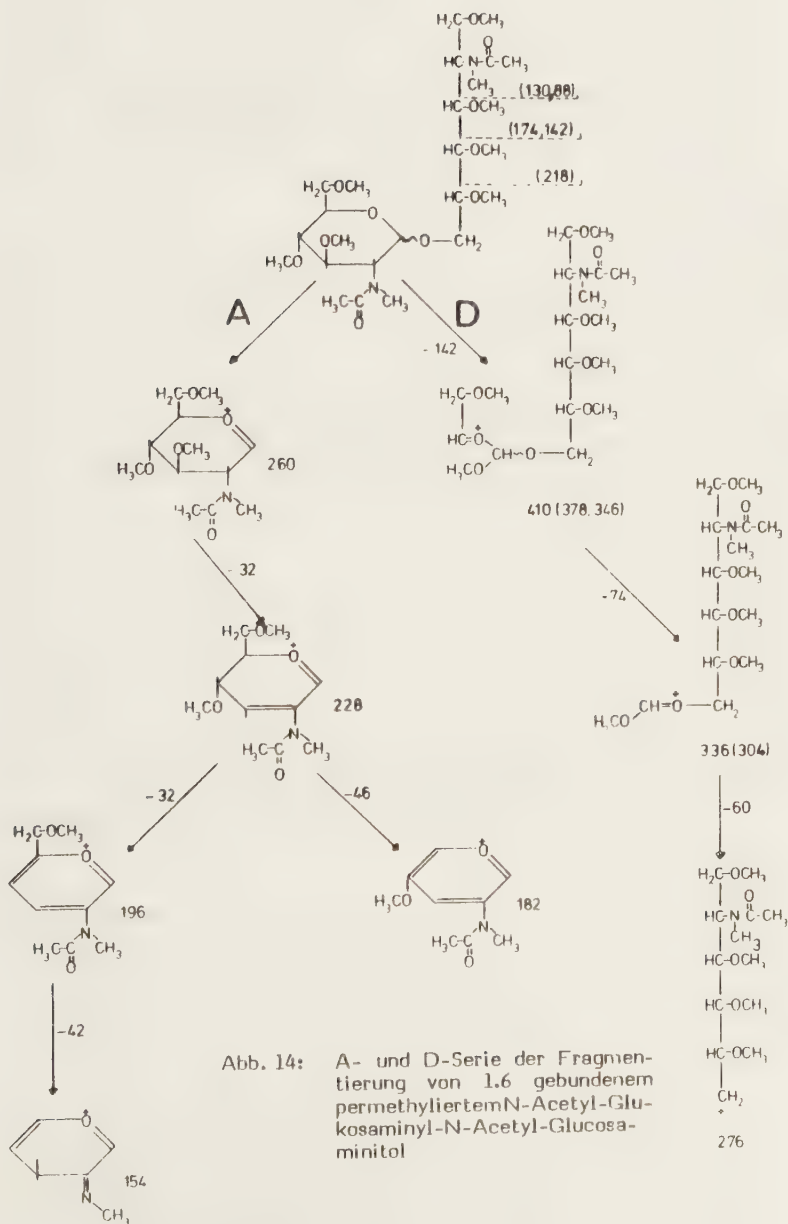
sind die relativen Retentionszeiten (t_R Maltotriitol = 1.00) der untersuchten Disaccharide zusammengefaßt, welche auf vier stationären Phasen unterschiedlicher Polarität bestimmt wurden. Abbildung 13 zeigt ein Gaschromatogramm eines Gemisches aller untersuchten Disaccharide mit Maltotriitol als inneren Standard.

Wie diese Ergebnisse zeigen, ist eine Aussage über die anomere Form der Disaccharide auf Grund der Retentionszeit bei der gaschromatographischen Analyse gut möglich. Die Art der Verknüpfung ist gaschromatographisch allerdings nur eindeutig zu bestimmen, falls 1.6 gebundene Glukosamin-Disaccharide vorliegen. Eine eindeutige Differenzierung der 1.3 und 1.4 gebundenen Glukosamin-Disaccharide war dagegen mit Hilfe der Massenspektrometrie möglich.

4.1.5.2. Massenspektrometrische Analyse der reduzierten und permethylierten N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide

Jedes der drei unterschiedlich verknüpften Disaccharide ist massenspektrometrisch durch charakteristische Fragmente zu erkennen (Tabelle 11). Die Fragmentierung der permethylierten Glukosamin-Disaccharide erfolgt hauptsächlich nach der A- und D-Serie der Fragmentierungen von Zuckern (58,68). In Abbildung 14 ist gezeigt, daß in der A-Serie zunächst die interglykosidische Bindung gespalten wird, wobei aus dem nicht reduzierenden Glukosamin ein Ion mit der Masse $m/e = 260$ entsteht. In der D-Serie wird zunächst der Ring des nicht reduzierenden Glukosamins unter Eliminierung des Fragmentes $m/e = 142$ aufgebrochen. Dabei entsteht das Fragment $m/e = 410$, welches in die Sekundärionen $m/e = 378$ und 346 ($378-32$) zerfällt.

Die Massenspektren der α - und β -Formen der Disaccharide sind qualitativ identisch. Da quantitative Unterschiede mit dem uns zur Verfügung stehenden Massenspektrometer nicht reproduzierbar waren, werden im Folgenden nur Spektren der α -Isomeren gezeigt und diskutiert.



In allen Spektren der 1.3, 1.4 als auch 1.6 gebundenen reduzierten Disaccharide kommen die Fragmente $m/e = 260, 228, 196$ und 154 vor. Reduktion der Disaccharide mit Natriumborodeuterid verursacht keine Veränderung bei diesen Fragmenten. Sie entstehen demnach aus dem nicht reduzierenden Glukosamin des Disaccharides nach der A-Serie der Fragmentierungen (Abb. 14).

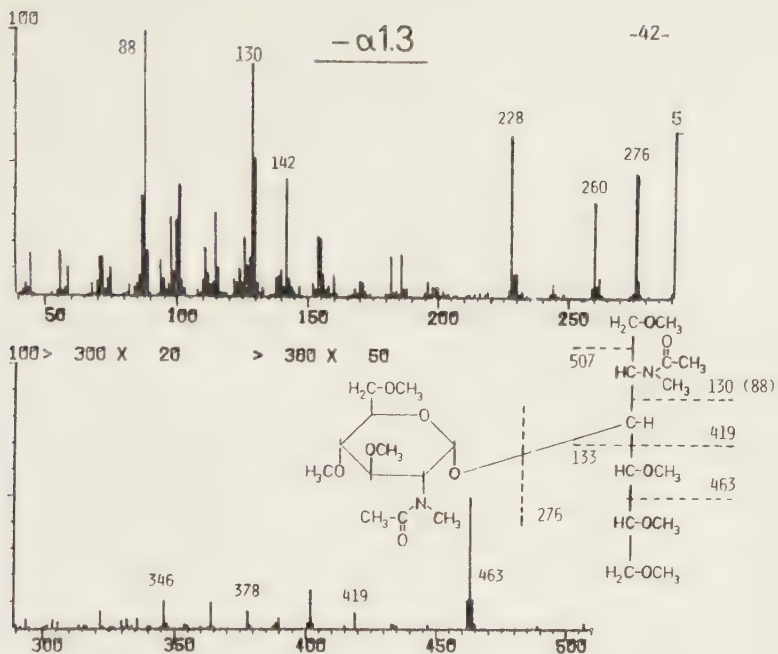
Außerdem findet man in allen Spektren die Fragmente $m/e = 378$ (410-32), 346 (378-32) und 276 . Diese werden nach Reduktion mit Natriumborodeuterid vollständig um eine Masseneinheit nach $m/e = 379$ beziehungsweise 347 und 277 verschoben (Tab. 11). Diese Ionen stammen wahrscheinlich aus der D-Serie. (Bei den 1.6 gebundenen Disacchariden werden allerdings nach Natriumborodeuteridreduktion die Fragmente $m/e = 346$ und 378 nur teilweise (etwa 50%) um eine Masseneinheit verändert (Tab. 10). Diese Tatsache wird später diskutiert).

In der D-Serie werden auch noch die Fragmente $m/e = 336$ und 304 (336-32) gebildet ($m/e = 337$ und 305 nach Reduktion mit Natriumborodeuterid). Diese Ionen sind allerdings nur in den Spektren der 1.6 gebundenen Disaccharide deutlich zu erkennen. Aus den 1.3 und 1.4 gebundenen Molekülen entstehen diese Fragmente nur mit geringerer Intensität.

In den Spektren aller Disaccharide ist auch das aus der D-Serie stammende Fragment $m/e = 142$ vorhanden.

Bei den 1.4 und 1.6 gebundenen Disacchariden ist dieses Fragment allerdings nach Reduktion mit Natriumborodeuterid zu etwa 50% nach $m/e = 143$ verschoben. Daraus ist zu erkennen, daß es in diesen Fällen zum Teil auch aus dem Alditolteil der Disaccharide stammen muß.

A



B

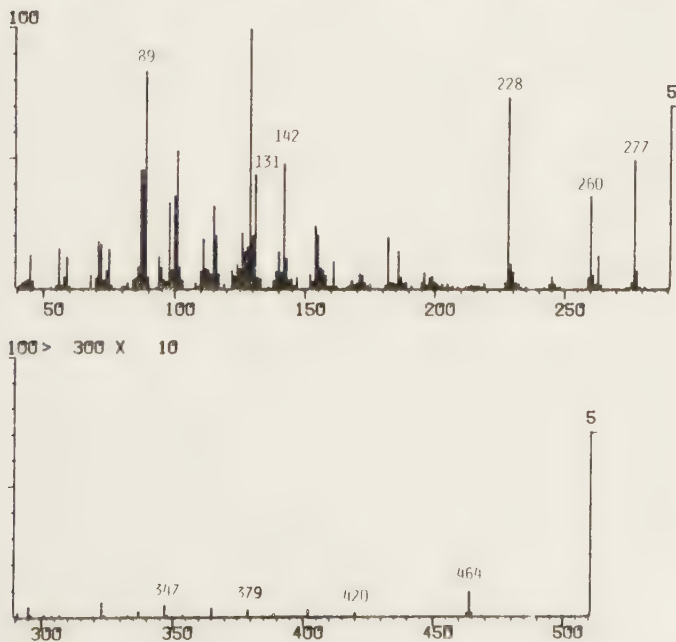


Abb. 15: Massenspektren von reduziertem, permethyliertem N-Acetylglukosaminyl- α -1,3-N-Acetylglukosaminitol. A = mit Natriumborhydrid und B = mit Natriumbordeuterid reduziert.

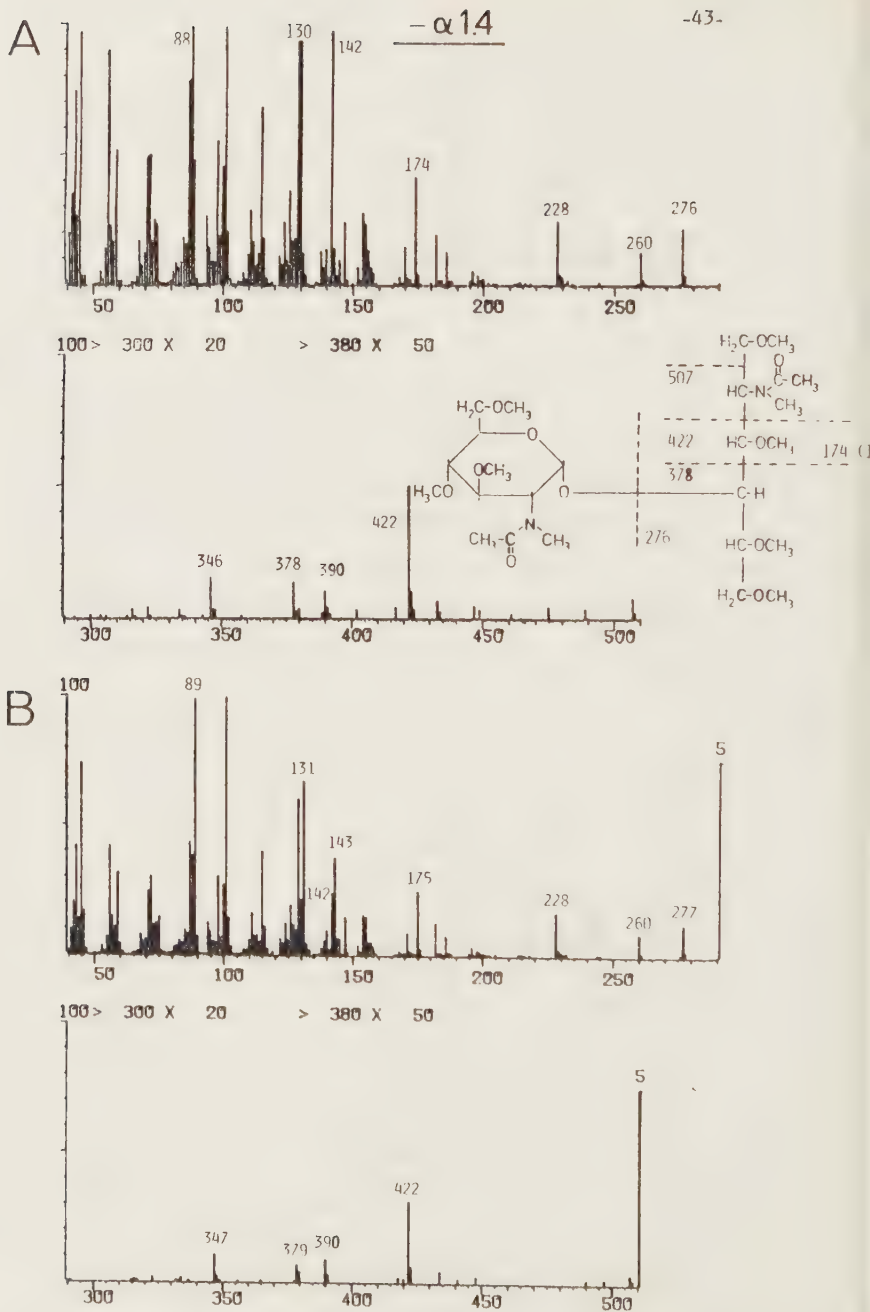


Abb. 16: Massenspektren von reduziertem, permethyliertem N-Acetylglukosaminyl- α -1,4-N-Acetylglukosaminitol.
A = mit Natriumborhydrid und B = mit Natriumbordeuterid reduziert.

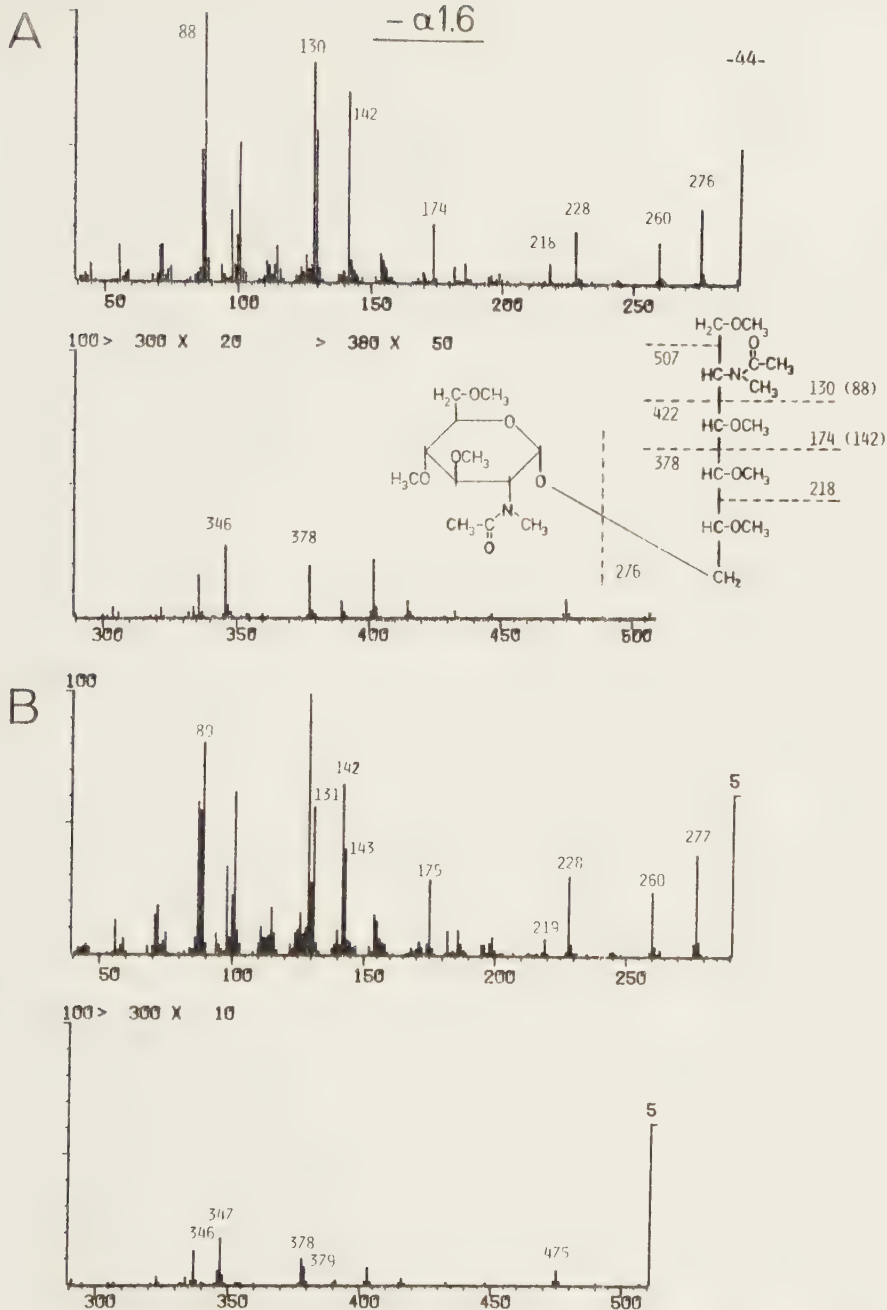


Abb. 17: Massenspektren von reduziertem, permethyliertem N-Acetylglukosaminyl- α -1.6-N-Acetylglukosaminitol.
A = mit Natriumborhydrid und B = mit Natriumbordeuterid reduziert.

Tabelle 10: Fragmente die allen Massenspektren der 1.3, 1.4 und 1.6 gebundenen permethylierten N-Acetyl-Glukosaminyl-N-Acetyl-Glukosaminitol Disacchariden gemeinsam sind.

Fragment	Shift um eine Masseneinheit nach NaB ² H ₄ Reduktion	Art der Entstehung des Fragments.
(m/e)		
260	-	A-Serie der Fragmentierung (GlcN)
228 (260-32)	-	
196 (228-32)	-	
154 (196-42)	-	
507 (M-45)	-	C ₁ /C ₂ Spaltung im GlcNol
378 (410-32)	¹ (+)	
346 (378-32)	¹ (+)	
276	+	
142	³ (+)	A + D-Serie (GlcNol)
130	+	
88 (130-42)	+	

¹ (+) = bei 1.6 gebundenen Glukosamin-Disacchariden nur teilweise geshiftet.
² bei 1.4 und 1.6 gebundenen Disacchariden.
³ (+) = bei 1.4 und 1.6 gebundenen Disacchariden nur teilweise geshiftet.

Tabelle 11:

Fragmente, welche spezifisch für die Massenspektren von 1,3, 1,4 und 1,6 gebundenen permethylierten N-Acetylglucosaminyl-N-Acetylglucosaminitol Disacchariden sind.

Fragment	Shift um eine Masseneinheit nach NaB^2H_4 Reduktion	Fragmente die nur anwesend sind in den Spektren der Disaccharide mit einer Bindung zwischen den C-Atomen	Fragmente, die gebildet werden durch Spaltung im Glucosaminiteil zwischen den C-Atomen
		1,3 1,4 1,6 ¹	
(m/e)			
463	+	+	4,5
419	+	+	3,4
133	-	(+)	3,4
422	-	-	2,3
390 (422-32)	-	-	2,3
218	+	-	4,5
475 (507-32)	-	-	1,2
174	+	-	3,4
336	+	(+)	
304 (336-32)	+	(+)	
			D-Serie der Fragmentierung

¹ Der Teil der Fragmente $m/e = 378$ und 346 (378-32) welcher nach NaB^2H_4 nicht geshtiftet ist, ist ein Hinweis auf eine 1,6-Bindung.

Weitere wichtige unspezifische Fragmente, die bei allen Disacchariden vorkommen, treten auf bei $m/e = 130$ und 88 ($130-42$). Sie werden um eine Masseneinheit nach Reduktion mit Natriumborodeuterid verschoben und entstehen durch Spaltung der Bindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 im Glukosaminitol-Teil des Moleküls. In keinem der Spektren ist der Molekularpeak ($m/e = 552$) zu finden.

Neben diesen allgemein vorkommenden Fragmenten kann jedes Disaccharid durch ganz spezifische Bruchstücke charakterisiert werden (Tab. 11).

Das 1,3 gebundene Disaccharid (Abb. 15, Tab. 11) erkennt man eindeutig am Fragment $m/e = 463$ (M-89). Dieses entsteht bei der Spaltung der C_4/C_5 -Bindung im Glukosaminitol-Teil des Moleküls. Einen weiteren guten Hinweis auf eine 1,3-Bindung gibt die Tatsache, daß kein Fragment mit der Masse $m/e = 174$ vorhanden ist. Dieses entsteht im Falle der 1,4 und 1,6 gebundenen Disaccharide bei der Spaltung der C_3/C_4 -Bindung im Alditol-Teil. Statt dessen wird beim 1,3 gebundenen Disaccharid bei dieser Spaltung das Fragment $m/e = 419$ gebildet. Das zweite Fragment dieser Spaltung mit der Masse $m/e = 133$ ist nur mit schwacher Intensität zu finden. Die Fragmente $m/e = 463$ und 419 sind nach Reduktion mit Natriumborodeuterid um eine Masseneinheit verschoben. Ein zum Vergleich untersuchtes α -1,3 Galaktosamin ergab ein Massenspektrum, das dem des isomeren Glukosamin-Disaccharids qualitativ identisch war.

Das Massenspektrum des 1,4 gebundenen Glukosamin-Disaccharids (Abb. 16, Tab. 11) weist charakteristische Fragmente bei den Massen $m/e = 422$ und 390 ($422-32$) auf. Das Primärion $m/e = 422$ entsteht bei der Spaltung der C_2/C_3 -Bindung im Glukosaminitol-Teil des Moleküls. Beide Fragmente sind nach Natriumborodeuteridreduktion nicht verschoben. Bei der Spaltung der C_3/C_4 -Bindung im Alditol-Teil entstehen die Fragmente $m/e = 174$ und 142 ($174-32$). Diese Ionen sind nach Natriumborodeuteridreduktion um eine

Masseneinheit nach höheren Werten gewandert. Das Fragment $m/e = 142$ wandert allerdings nur teilweise (50%), da es auch in der D-Serie aus dem nicht reduzierenden Glukosamin-Rest entsteht.

Das 1.6 gebundene Disaccharid (Abb. 17, Tab. 11) kann eindeutig am Fragment $m/e = 218$ erkannt werden. Dieses entsteht bei der Spaltung der C_4/C_5 -Bindung im Glukosaminitol-Teil und wird nach $m/e = 219$ verschoben, wenn das Disaccharid mit Natriumbordeuterid reduziert worden ist. Wie beim 1.4 gebundenen Disaccharid wird auch die C_3/C_4 -Bindung im Alditol-Teil gespalten, wobei die Ionen $m/e = 174$ und 142 entstehen, welche nach Natriumbordeuteridreduktion nach $m/e = 175$ und 143 verändert sind. Die bei der gleichen Spaltung entstehenden Gegenfragmente $m/e = 378$ und 346 ($378-32$) werden, wie erwartet, bei Reduktion mit Natriumbordeuterid nicht verändert. Die Fragmente $m/e = 378$ und 346 entstehen allerdings auch in der D-Serie durch Abspaltung des Ions $m/e = 142$ aus dem nicht reduzierenden Glukosamin-Rest. In diesem Fall macht sich das Deuterium bei der Reduktion mit Natriumbordeuterid bemerkbar. Deshalb werden diese Fragmente etwa zur Hälfte nach $m/e = 379$ und 347 verschoben.

Überraschender Weise erfolgt im Falle der 1.4 gebundenen Disaccharide nach Natriumbordeuteridreduktion eine vollständige Verschiebung der Fragmente $m/e = 378$ und 346 um eine Masseneinheit. Deshalb ist der unveränderte Teil dieser Ionen für die 1.6-Bindung spezifisch.

4.1.5.3. Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse von nicht reduzierten Glukosamin-Disacchariden

Zum Vergleich wurden auch die nicht reduzierten Glukosamin-Disaccharide methyliert und anschließend gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. Die gaschromatographische Analyse ergab für jedes einzelne untersuchte nicht reduzierte Glukosamin-Disaccharid zwei Peaks,

die der α - und β -Form des Methylglykosides entsprechen (Abb. 18, Peak 1 und 2. α - und β -Methylglykoside des β -1.4 gebundenen Glukosamin-Disaccharides). Die Retentionszeit dieser beiden Peaks war größer als die des entsprechenden reduzierten Glukosamin-Disaccharids (Abb. 18, Peak IS).

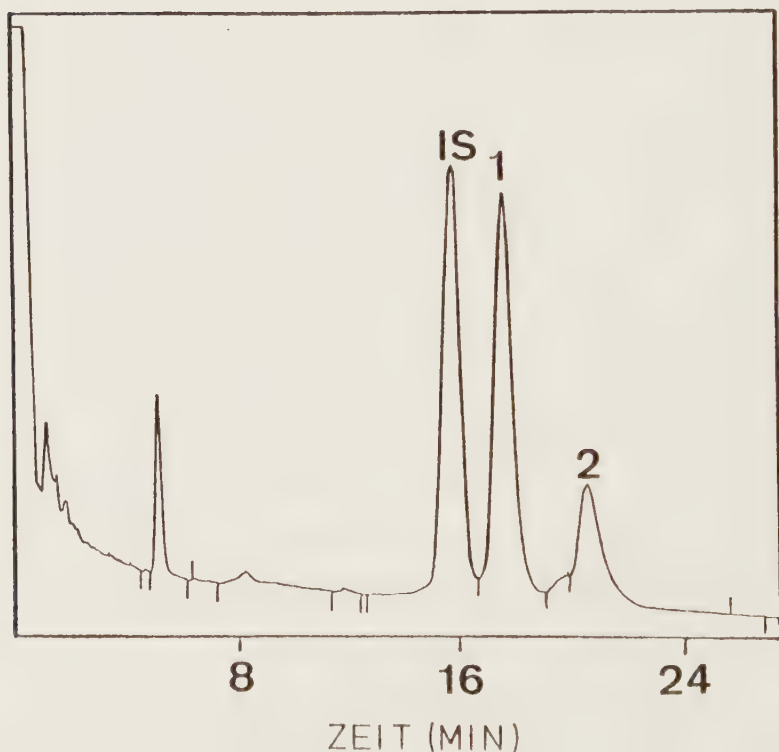


Abb. 18: Gaschromatogramm von permethylierten β -1.4-N-Acetylglukosamin-Disacchariden.
 Peak IS = Reduziertes β -1.4-N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharid (innerer Standard)
 Peak 1 und 2 = α - und β -Methylglykoside des nicht reduzierten β -1.4-N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharides.
 (Eine Zuordnung der Peaks zum α - oder β -Methylglykosid war nicht möglich).

Leider konnte nicht bestimmt werden, welcher der beiden Peaks das α - und welcher das β -Methylglykosid repräsentiert. Auffallend war die Tatsache, daß eine der isomeren Formen leichter gebildet wurde, denn der zuerst von der Säule eluierende Peak war in allen Fällen größer als der zweite Peak (Verhältnis etwa 4:1).

Die Massenspektren der nicht reduzierten Glukosamin-Disaccharide weisen keine bindungsspezifischen Fragmente auf. Die α - und β -Formen der isomeren Paare der 1,3, 1,4 und 1,6 gebundenen nicht reduzierten Glukosamin-Disaccharide ergeben die Hauptfragmente $m/e = 362$ (MG = 536-142-32), 330 (362-32) und 320 (362-42). Das bedeutet, daß auch hier zunächst der Ring des nicht reduzierenden Glukosamins unter Eliminierung von $m/e = 142$ aufgebrochen wird (Abb. 14, Serie D). Die Fragmente $m/e = 260$, 228, 196, 182 und 154, wie sie nach der A-Serie entstehen, liegen mit hoher Intensität vor, da sie ja aus zwei Glukosaminringen entstehen. Die Gaschromatogramme und Massenspektren von nicht reduzierten Disacchariden liefern also nicht so eindeutige Daten wie diejenigen von reduzierten Disacchariden.

4.1.5.4. Anwendung der direkten GLC-MS-Analyse von Glukosamin-Disacchariden für die Untersuchung von Lipoid A

Um den Nutzen der aus den Untersuchungen der permethylierten Glukosamin-Disaccharide gewonnenen Daten für die Lipoid A Analyse zu überprüfen, wurden zunächst die Lipoid A-Rückgrate von Salmonella minnesota und Proteus mirabilis hergestellt. Diese bestehen, wie schon früher gezeigt worden war (30,41,138), aus einem β -1,6 gebundenen Glukosamin-Disaccharid.

Die gaschromatographische Untersuchung der reduzierten, N-acetylierten und permethylierten Disaccharide ergab jeweils nur einen Peak. Zusätzlich wurde nun das Lipoid A der drei Yersinia enterocolitica Stämme 490 M, 75 R

und 161-45a auf die gleiche Art untersucht. Auch hier erschien jeweils nur ein Peak mit der Retentionszeit eines β -1.6 gebundenen Disaccharids (Abb. 19). Die Massenspektren bestätigten in allen Fällen die 1.6-Bindung (Tab. 12).

Tabelle 12: Gaschromatographische und massenspektrometrische Daten der reduzierten, N-acetylierten und permethylierten Lipoid A- Rückgrate von Salmonella minnesota, Proteus mirabilis und Yersinia enterocolitica.

Lipoid A-Rückgrat aus:	Retentionszeit (t_R) (Gaschromatograph) SE-30, 10%, 270°C	Charakteristische Fragmente aus dem Massenspektrum
Salmonella minnesota R 595	21,5 Min.	378, 346, 276 260, <u>218</u> , 174
Proteus mira- bilis 45a	21,4 Min.	378, 346, 276 260, <u>218</u> , 174
Yersinia entero- colitica 490 M	21,5 Min.	378, 346, 276 260, <u>218</u> , 174
Yersinia entero- colitica 75 R	21,5 Min.	378, 346, 276 260, <u>218</u> , 174
Yersinia entero- colitica 161-45a	21,5 Min.	378, 346, 276 260, <u>218</u> , 174

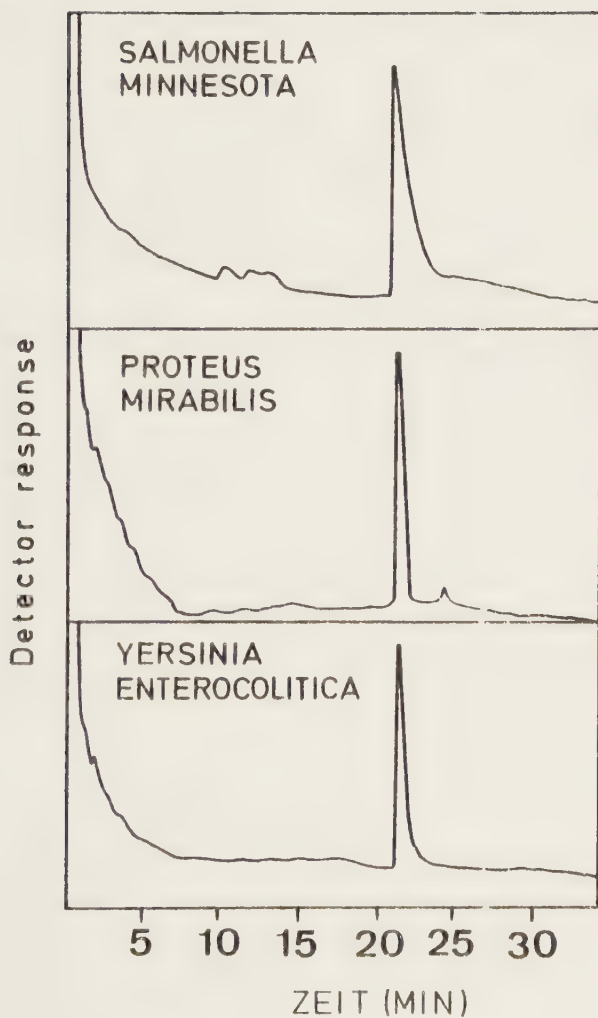


Abb. 19: Gaschromatogramme der reduzierten, N-acetylierten und permethylierten Lipoid A-Rückgrate von Salmonella, Proteus und Yersinia (SE-30, 10%, 270°C).

4.1.6. Diskussion der Kapitel 4.1.4. und 4.1.5.

Wie in den beiden vorhergehenden Kapiteln gezeigt wurde, ist die Bestimmung der Art der interglykosidischen Bindung im Lipoid A-Rückgrat anhand der vollständigen Methylierungsanalyse nach Stellner et al. (112) nicht ganz problemlos. Dennoch waren die Ergebnisse eindeutig genug, um auch für das Lipoid A von Yersinia enterocolitica ein β -1,6 gebundenes Glukosamin-Disaccharid als Rückgrat zu postulieren. Um dieses zu erhärten, untersuchten wir nun die Möglichkeiten der direkten GC-MS-Analyse für unterschiedlich verknüpfte permethylierte Glukosamin-Disaccharide.

Die geschilderten Untersuchungen zeigen, daß die direkte Analyse dieser Disaccharide ohne deren Hydrolyse möglich ist. In der Gaschromatographie eluiert jeweils die α -Form der 1,3, 1,4 oder 1,6 gebundenen Glukosamin-Disaccharide nach der entsprechenden β -Form. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß permethylierte α -1,3 und α -1,6 gebundene D-Galaktosyl-N-Acetyl-D-Glukosaminitol-Disaccharide unter ähnlichen Bedingungen kleinere Retentionszeiten als die β -Isomeren aufweisen (78).

Mit den verwendeten Phasen ist es leider nicht möglich, die α -1,3 und α -1,4 gebundenen Disaccharide einerseits oder die entsprechenden β -Anomere andererseits von einander zu trennen. Die α - und β -Anomeren der 1,6 gebundenen Glukosamin-Disaccharide werden aber gut von denen der 1,3 und 1,4 gebundenen getrennt. Diese Tatsache ist von großer Wichtigkeit für die Lipoid A-Analyse, da das Rückgrat meist aus einem β -1,6 gebundenen Glukosamin-Disaccharid besteht. So kann anhand der Retentionszeiten nach der Gaschromatographie zumindest ein α - oder β -1,6 gebundenes Glukosamin-Disaccharid eindeutig identifiziert werden. Außerdem ist eine klare Aussage über die anomere Form der Disaccharide möglich.

Eine eindeutige Bestimmung der Position der interglykosidischen Bindung ermöglicht die massenspektrometrische Analyse. Das 1.3 gebundene Disaccharid zerfällt in charakteristische Fragmente mit den Massen $m/e = 463$ und 419. Das 1.4 gebundene Disaccharid kann an den Massen $m/e = 422$ und 390 erkannt werden und das 1.6 gebundene an der Masse $m/e = 218$. Alle diese bindungsspezifischen Ionen werden durch die Spaltung einer C-C-Bindung im Glukosaminitol-Teil des Moleküls erzeugt (Tab. 11).

Das Fragmentierungsmuster von permethylierten N-Acetyl-Glukosaminyl-Glukosaminitol-Disacchariden ist bei den kleinen Massen demjenigen von permethylierten N-Acetyl-Glukosaminitol-Derivaten sehr ähnlich. Dabei fallen die Ionen $m/e = 130$ und 88 (130-42) besonders auf (17,40). Bei den 1.6 gebundenen Glukosamin-Disacchariden mit amidgebundenen langkettigen Fettsäuren entstehen bei der Spaltung der C_2/C_3 Bindung im Glukosaminitol-Teil des Moleküls die Fragmente $m/e = 300$ und 268 (300-32), bei N-Substitution mit 3-Methoxydodecansäure (43), und $m/e = 272$ und 240 (272-32) bei N-Substitution mit 3-Methoxydecanensäure (124). In diesen Fällen ist das Fragment $m/e = 88$ (130-42) welches in den Spektren permethylierter N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide vorkommt wie zu erwarten nicht vorhanden.

Wie schon oben erwähnt (siehe 4.1.4.), wurde von Hase und Rietschel angenommen (40), daß bei der Permethylierung von N-Acetyl-Glukosaminitol eine Methylacetimidatgruppe entsteht. Die Bildung dieser Gruppe ist bewiesen worden für die Methylierung nach Kuhn mit Silberperchlorat als Katalysator (61). Nach Hase und Rietschel sollte bei Methylierung nach Hakomori im Falle eines 6-O-substituierten N-Acetyl-Glukosaminitols das Carbonylsauerstoffatom der Acetylgruppe nahezu vollständig methyliert werden, während bei einem 4-O-substituierten N-Acetyl-Glukosaminitol zu etwa gleichen Teilen die Methylacetimidat- und die N-Methylacetamido-Gruppe gebildet werden sollte (40).

Da gezeigt worden war, daß das Methylacetimidat eine wesentlich kürzere Retentionszeit als das N-Methylacetamido-Derivat besitzt (61), wäre eine Trennung der entsprechenden Derivate auch bei den Disacchariden zu erwarten gewesen. Die direkte gaschromatographische Analyse von permethylierten 1.4 gebundenen N-Acetyl-Glukosamin-Disacchariden zeigte aber jeweils nur einen Peak für sowohl die α - als auch die β -Form. Diese Befunde sind im Einklang mit den Resultaten von Caroff und Szabo (12), die zeigten, daß sich bei der Methylierung nach Hakomori nicht die Methylacetimidat-Gruppe sondern das N-Methylacetamido-Derivat bildet, daß aber bei der anschließenden sauren Hydrolyse eine O-Demethylierung am C-Atom 1 stattfindet. Diese Probleme der O-Demethylierung und die damit verbundenen Schwierigkeiten der Interpretation von Gaschromatogrammen und Massenspektren fallen fort, wenn das permethylierte Disaccharid nicht mehr hydrolysiert, sondern direkt mit Hilfe der kombinierten GLC-MS untersucht werden kann.

Bei früheren Untersuchungen des Lipoid A-Rückgrats wurde die anomere Konfiguration des nicht reduzierenden Glukosamins mit Hilfe von N-Acetyl-Glukosaminidase ermittelt (30,43). Anhand der Geschwindigkeit, mit der die glykosidische Bindung gespalten wird, kann man erkennen, ob die α - oder β -Form vorliegt. Das freigesetzte N-Acetyl-Glukosamin wird mit der direkten Morgan-Elson-Reaktion bestimmt (siehe 6.2.2.2.1.). Beim β -1.6 gebundenen Glukosamin-Disaccharid ist die Reaktion bereits nach etwa 60 Minuten abgeschlossen. Am β -1.4 gebundenen Glukosamin-Disaccharid wirkt das Enzym wesentlich langsamer und α -gebundene Disaccharide werden gar nicht gespalten (Abb. 20). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene neue Methode der direkten Methylierungsanalyse von Glukosamin-Disacchariden vereinfacht die Bestimmung der anomeren Konfiguration wesentlich.

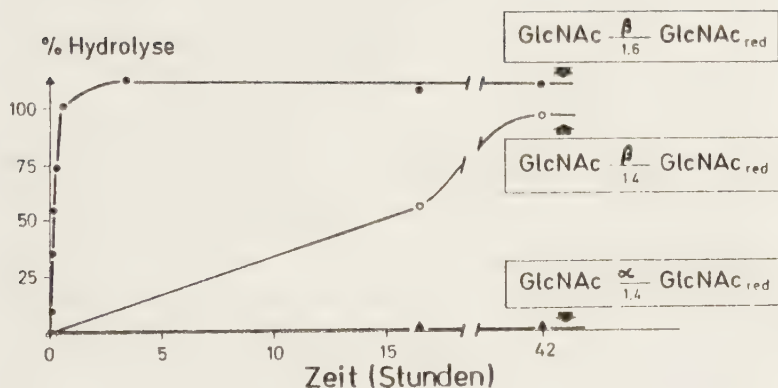


Abb. 20: Enzymatische Analyse der Konfiguration von N-Acetyl-Glukosaminyl-N-Acetylglukosaminol mit N-Acetyl-Glukosaminidase. Aufgetragen ist die freigesetzte Menge N-Acetyl-Glukosamin (bestimmt mit der direkten Morgan-Elson-Reaktion) gegen die Zeit (nach Hase).

Zwar sind sich die Massenspektren der beiden Anomeren eines jeden Disaccharides so ähnlich, daß aus ihnen keine Schlußfolgerungen über die anomere Konfiguration gezogen werden kann, aber anhand der Retentionszeiten bei der gaschromatographischen Analyse ist eine eindeutige Trennung der α - von den β -Isomeren möglich. Die GLC-MS-Analyse erleichtert somit ganz erheblich die Strukturanalyse von Lipoid A. Einerseits kann die Position der glykosidischen Bindung ohne Hydrolyse und weitere Modifikation ermittelt und andererseits die anomere Konfiguration des nicht reduzierenden Glukosamins ohne enzymatische Analyse bestimmt werden.

4.1.7. Identifizierung des Glukosamin-Restes, der die estergebundene Phosphatgruppe trägt

Aus den in 4.1.2. beschriebenen Analysen von Yersinia enterocolitica Lipoid A geht hervor, daß ein Glukosamin-Disaccharid etwa 2 Phosphatgruppen trägt. Eine dieser Gruppen ist, wie in 4.1.3. bewiesen, in säurelabiler Bindung an das C-Atom 1 des reduzierenden Glukosamin-Restes des Disaccharides geknüpft. Die andere Phosphatgruppe ist esterartig in säurestabiler Bindung an einen der beiden Glukosamin-Reste im Disaccharid geknüpft. Um zu entscheiden, welcher Glukosamin-Rest diese Phosphatgruppe trägt, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Lipoid A-OH red. (3 mg) wurde mit 4 N HCl (1 ml) 10 Stunden bei 100°C behandelt. Das Hydrolysat wurde am Rotationsverdampfer evaporiert und in etwa 0.05 ml Wasser aufgenommen. Die unlöslichen Anteile (Fettsäuren) wurden abzentrifugiert und der Überstand mit Hilfe der Hochspannungspapieroelektrophorese (120 Min., 120 mA, siehe 6.2.4.3.) aufgetrennt. Mit Ninhydrin konnten drei Fraktionen sichtbar gemacht werden. Die Hauptfraktion (Fraktion 1) konnte aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit ($M_{\text{GlcN}} = 1.00$) als Glukosaminitol identifiziert werden. Die beiden anderen Fraktionen erschienen nahe der Neutralzone und hatten Wanderungsgeschwindigkeiten von $M_{\text{GlcN}} = 0.16$ und 0.12 (Fraktion 2 und 3). Beide Fraktionen wurden gemeinsam eluiert und im Aminosäureanalysator mit dem Programm 1 (siehe 6.2.4.4.) untersucht. Das Chromtogramm zeigt einen Peak nach 6 Minuten und 40 Sekunden (Abb. 21, Peak 1). Nach dieser Zeit eluieren Phosphorsäureester von Glukosamin, Glukosaminitol und Athanolamin. Um die Substanz, welche den Phosphatrest trägt zu charakterisieren, wurden die vereinigten Fraktionen (Fraktion 2 und 3) mit Phosphatase behandelt (siehe 6.2.1.9.) und danach nochmals im Aminosäureanalysator untersucht. Wie

erwartet war der nach 6-7 Minuten eluierende Peak verschwunden. Dafür zeigte das Chromatogramm nun zwei neue Peaks, die eine identische Laufzeit wie Glukosamin ($R_t = 52$ Min. 40 Sek., Abb. 21, Peak 2) und Glukosaminitol ($R_t = 56$ Min. 30 Sek., Abb. 21, Peak 3) aufwiesen.

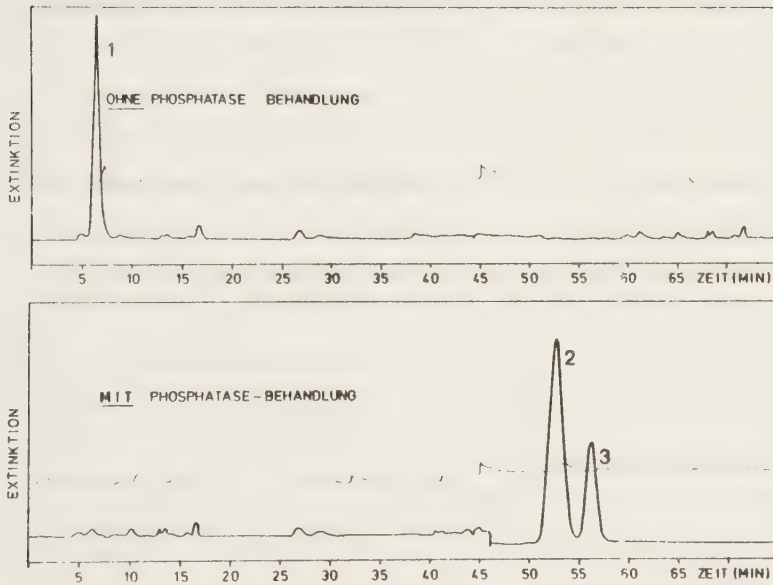


Abb. 21: Chromatogramm von Glukosamin- und Glukosaminitol-Phosphat im Aminosäureanalysator vor Phosphatasebehandlung (Peak 1) und nach Phosphatasebehandlung (Peak 2 = Glukosamin, Peak 3 = Glukosaminitol).

Glukosamin und Glukosaminitol erschienen etwa in einem Verhältnis von 3:1. Dieses Ergebnis macht wahrscheinlich, daß der estergebundene Phosphat-Rest am nicht reduzierenden Glukosamin gebunden ist. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Glukosaminitol ist aber, daß bei der sauren Hydrolyse

zur Herstellung von Lipoid A-OH (siehe 4.1.3.2. und Abb. 9) die interglykosidische Bindung teilweise gespalten wird, sodaß N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Glukosamin-Phosphat entstehen. Bei der anschließenden Reduktion zum Lipoid A-OH red. wäre dann nicht nur das reduzierende Glukosamin des Disaccharides, sondern auch das freigesetzte phosphattragende Glukosamin reduziert. Nach der salzsauren Hydrolyse mit 4 N HCl lägen deshalb sowohl Glukosaminphosphat als auch Glukosaminitolphosphat vor, welche bei der Hochspannungspapieroelektrophorese und im Aminosäureanalysator nicht zu unterscheiden sind.

Um zweifelsfrei bestimmen zu können, an welchen Glukosamin-Rest des Disaccharides die Phosphatgruppe gebunden ist, mußte ein anderer Weg beschritten werden. Etwa 14 mg Lipoid A-OH red. wurden 19 Stunden hydrazinolysiert (siehe 6.2.1.2.), um die amidgebundenen Fettsäuren abzuspalten. Bei der anschließenden Hochspannungspapieroelektrophorese (siehe 6.2.4.3.) wurden durch Anfärben mit alkalischer Silbernitratlösung nach Trevelyan 4 Fraktionen sichtbar. Fraktion 1 ($M_{\text{GICN}} = 1,11$) entsprach dem Glukosaminyl-Glukosaminitol-Disaccharid. Fraktion 2 ($M_{\text{GICN}} = 1,00$) bestand aus Glukosaminitol. Fraktion 3 ($M_{\text{GICN}} = 0,476$) wurde erst nach Erhitzen des Chromatographiepapiers über Wasserdampf sichtbar und entsprach dem Glukosamin-Disaccharid mit einem Phosphatrest (30). Fraktion 4 verhielt sich wie eine neutrale Substanz und wurde nicht weiter untersucht.

Zur Bestimmung der Position des estergebundenen Phosphates wurde die Fraktion 3 eluiert und, wie oben für Lipoid A-OH red. beschrieben, mit 4 N HCl 10 Stunden bei 100°C hydrolysiert, und erneut papieroelektrophoretisch aufgetrennt. Die Fraktion mit der Wanderungsgeschwindigkeit $M_{\text{GICN}} = 0,14$ wurde einerseits direkt und andererseits nach Phosphatasebehandlung (siehe 6.2.1.9.) mit dem Aminosäureanalysator untersucht. Vor Phosphatasebe-

handlung erschien Glukosaminphosphat (Peak 1, Abb. 21) während nach der Abspaltung des Phosphates nur Glukosamin (Peak 2, Abb. 21) zu registrieren war. So ist eindeutig bewiesen, daß der estergebundene Phosphat-Rest sich am nicht reduzierenden Glukosamin des Lipoid A-Rückgrats befindet.

Damit ist aber noch keine Aussage über die genaue Position dieses Phosphates getroffen. Der gesamte Analysengang vom LPS bis zum phosphatasebehandelten Glukosamin ist äußerst aufwendig, die benötigten Mengen sind relativ groß und das Ergebnis ist letztendlich nicht sehr aussagekräftig. Daher mußten wir nach anderen Wegen suchen, um die Position des estergebundenen Phosphates zu bestimmen.

4.1.8. Bestimmung der genauen Position des estergebundenen Phosphates am nicht reduzierenden Glukosamin des Lipoid A-Grundgerüsts

Closse (13) und Gmeiner (30) haben an Salmonella Lipoid A durch indirekte Methoden wie die Perjodatoxidation wahrscheinlich gemacht, daß die estergebundene Phosphatgruppe in Position 4 des nicht reduzierenden Glukosamins im Lipoid A-Disaccharid gebunden ist. Es war anzunehmen, daß eine eindeutige Bestimmung der Position der estergebundenen Phosphatgruppe mit Hilfe der GLC-MS-Analyse möglich sei. Bisher gelang es zwar nur in wenigen Fällen, Zuckerphosphate für eine solche Analyse geeignet zu derivatisieren. Neuere Arbeiten über silylierte aber auch methylierte Nucleotide (63,97,118) ermutigten uns, die Möglichkeiten zu untersuchen, Glukosaminphosphate nach der Hakomori-Methode zu methylieren und mit der kombinierten GLC-MS-Analyse zu charakterisieren.

4.1.8.1. Untersuchung von Zuckerphosphaten mit Hilfe der kombinierten GLC-MS-Analyse

4.1.8.1.1. Gaschromatographische Analyse von Zuckerphosphaten

Als Modellsubstanzen wurden Glukosamin-6-Phosphat und reduziertes Glukosamin-6-Phosphat mit Natronlauge und Acetanhydrid (siehe 6.2.1.3.1.) N-acetyliert und nach Hakomori methyliert (siehe 6.2.1.7.). Zum Vergleich wurde auch Glukose-6-Phosphat untersucht. Nach Reinigung über Sephadex LH-20 wurden die methylierten Zuckerphosphate direkt gaschromatographisch untersucht (SE-30, 10%, 200°C). Erfreulicher Weise erzeugte jedes Zuckerphosphat einen sauberen schlanken Peak, womit bewiesen war, daß Zuckerphosphate mit der Methylierung nach Hakomori geeignet für die Gaschromatographie derivatisiert werden können (Abb. 22). Das Gaschromatogramm des reduzierten Glukosamin-6-Phosphates zeigte allerdings zwei Peaks mit vergleichbarer Intensität (Peak 3 und 4 in Abb. 22). Wie die

Massenspektren aufklären ist der Phosphat-Rest bei der Methylierung offensichtlich gewandert, sodaß es sich bei diesen beiden Peaks um permethyliertes Glukosaminitol-5- und -6-Phosphat handelt (siehe 4.1.8.1.2. und Abb. 23). Ihre Retentionszeit ist kleiner als diejenige des nicht reduzierten Glukosamin-6-Phosphates (Tab. 13 und Abb. 22).

Tabelle 13: Retentionszeiten verschiedener methylierter Zuckerphosphate auf einer SE-30-Säule (10%) bei 200°C. Die Retentionszeiten sind im Verhältnis zu der von permethyliertem N-Acetylglukosamin ($t_R = 1,00$) angegeben.

Permethyliertes Glukosaminderivat	Peak Nummer ⁺	Retentionszeit t_R
N-Acetylglukosamin	1	1,00
N-Acetyl-Glukose-6-Phosphat	2	1,54
N-Acetyl-Glukosaminitol-5-Phosphat	3	3,69
N-Acetyl-Glukosaminitol-6-Phosphat	4	4,65
N-Acetyl-Glukosamin-6-Phosphat	5	5,47

⁺ entsprechend den Zahlen in Abb. 22

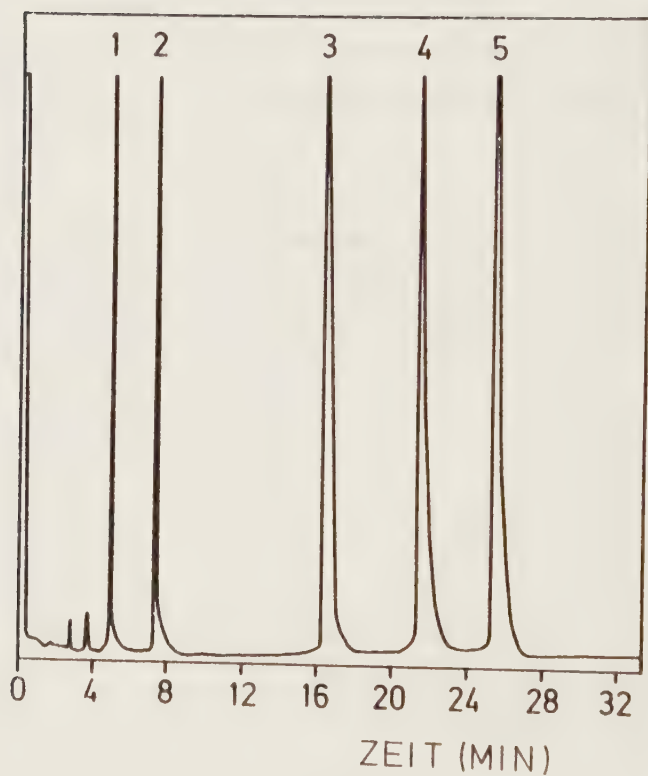


Abb. 22: Gaschromatogramm von permethylierten Zuckerphosphaten

(SE-30, 10%, 200°C)

Peak 1 = permethyliertes N-Acetylglukosamin (innerer Standard)

Peak 2 = permethyliertes Glukose-6-Phosphat

Peak 3 = permethyliertes N-Acetyl-Glukosaminitol-5-Phosphat

Peak 4 = permethyliertes N-Acetyl-Glukosaminitol-6-Phosphat

Peak 5 = permethyliertes N-Acetyl-Glukosamin-6-Phosphat

4.1.8.1.2. Massenspektrometrische Analyse von Zuckerphosphaten

Die Massenspektren von Peak 3 und 4 sind sich sehr ähnlich (Abb. 23). An den Fragmenten $m/e = 356$ (M-45) und 324 (356-32) können beide Peaks eindeutig Glukosaminitolphosphaten zugeordnet werden. Bei der Spaltung der Bindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 entstehen einerseits die Fragmente $m/e = 130$ (88) und andererseits $m/e = 271$, 239 (271-32) und 145 (271-126), 126 = Phosphorsäuredimethylester). Die Spaltung der C_3/C_4 -Bindung ergibt die Fragmente $m/e = 227$, 195 (227-32) 175 und 143 (175-32).

Peak 4 konnte durch die Fragmente $m/e = 183$, 263 und 239 (271-32) als Glukosaminitol-6-Phosphat identifiziert werden.

Das Massenspektrum von Peak 3 (Abb. 23 A) unterscheidet sich von dem von Peak 4 dadurch, daß das Fragment $m/e = 183$ nicht anwesend ist. Auch das Fragment $m/e = 239$ (271-32) fehlt völlig, wobei das Ion $m/e = 271$ eine sehr hohe Intensität aufweist. Dies bedeutet, daß Fragment $m/e = 271$ offensichtlich kein Methanol abgespalten. Dafür ist das Fragment $m/e = 195$ (227-32) einer der Hauptpeaks. Besonders charakteristisch aber ist die Anwesenheit von Fragment $m/e = 218$ (219 nach Reduktion mit Natriumborodeuterid, Spaltung der C_4/C_5 -Bindung). Hierdurch ist eindeutig bewiesen, daß Peak 3 durch Glukosaminitol-5-Phosphat und nicht durch Glukosaminitol-4-Phosphat hervorgerufen wird. Wir nehmen an, daß bei der Methylierung von Glukosaminitol-6-Phosphat die Phosphatgruppe wandert, sodaß Glukosaminitol-5-Phosphat ein Artefakt darstellt, das aus Glukosaminitol-6-Phosphat entstanden ist.

Das Massenspektrum von Glukosamin-6-Phosphat (Peak 5) zeigt hauptsächlich Fragmente der A-Serie¹ (Abb. 24): $m/e = 354$ (M-31), 312 (354-42), 322 (354-32), 196 (322-126) und 154 (196-42). Die ohne Ladung eliminierte

¹ Kotchetkov (58) formulierte mehrere Serien (A-K) von Spaltungsmöglichkeiten für permethylierte Neutralzucker.

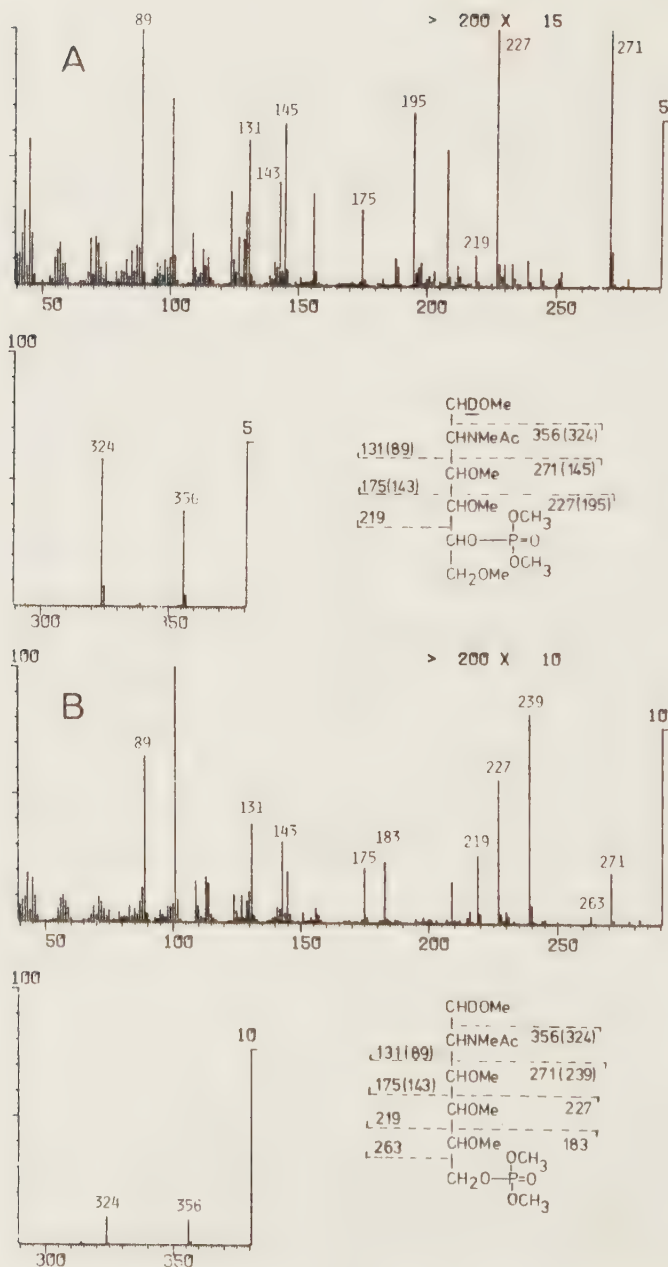


Abb. 23: Massenspektren von reduzierten (NaBD₄) und permethylierten N-Acetyl-Glucosaminitol-Phosphaten.
A.) Massenspektrum von Peak 3 Abb. 22 (Glucosaminitol-5-P)
B.) Massenspektrum von Peak 4 Abb. 22 (Glucosaminitol-6-P)

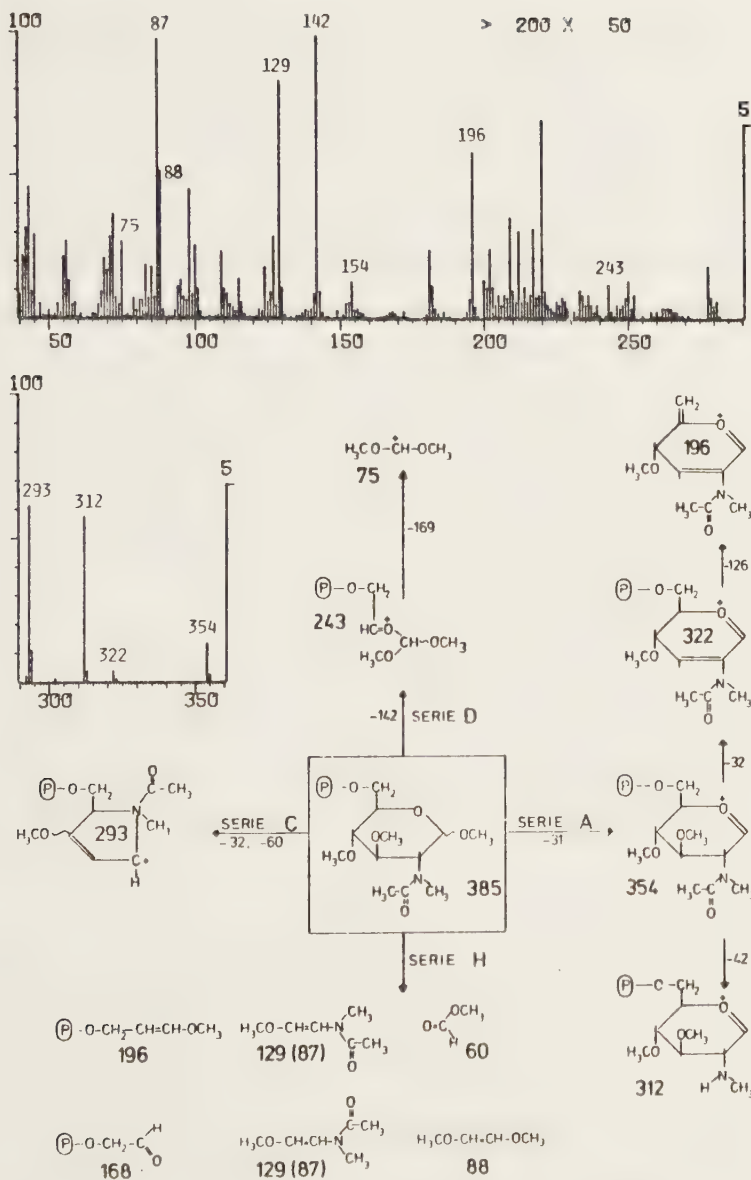


Abb. 24: Massenspektrum von permethyliertem Glukosamin-6-Phosphat und dessen wichtigste Fragmentierungswege. P = Phosphorsäuredimethylester-Gruppe

Masse 126 entspricht dem Phosphorsäuredimethylester. Außerdem sind Fragmente der C-Serie ($m/e = 293$, = M-32-60) und der H-Serie ($m/e = 129$ (87) und 88) zu finden (Abb. 24). In der D-Serie wird der Ring unter Eliminierung von $m/e = 142$ gespalten.

Die Tatsache, daß dieses Fragment vorhanden ist, beweist eindeutig, daß die Phosphatgruppe nicht an die Position 4 des Glukosamins gebunden ist.

Das Massenspektrum von Peak 2 (Glukose-6-Phosphat), zeigt auch Fragmente der A-Serie mit den Massen $m/e = 313$ (M-31), 281 (313-32) und 155 (281-126). In der D-Serie wird der Pyranosering bei Neutralzuckern unter Eliminierung von $m/e = 101$ aufgebrochen, wobei im Falle des Glukose-6-Phosphates das Fragment $m/e = 243$ entsteht. Beide Ionen ($m/e = 101$ und 243) sind mit hoher Intensität vorhanden. Auch die Fragmente der H-Serie ($m/e = 196$ und 88) sind deutlich zu erkennen.

4.1.8.1.3. Diskussion der GLC-MS Analyse von Zuckerphosphaten

Wie am Beispiel von Glukose-6-Phosphat, Glukosamin-6-Phosphat und Glukosaminitol-6-Phosphat gezeigt werden konnte, ist es möglich, Zuckerphosphate nach Methylierung mit der Hakomori-Methode gaschromatographisch gut zu trennen, und damit einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen.

Aus den Massenspektren kann man eindeutig erkennen, daß es sich um Zuckerphosphate handelt. Leider sind aber nur sehr große, eine Phosphatgruppe tragende Fragmente vorhanden. Bei den kleineren Ionen wurde diese meist als Dimethylester ($m/e = 126$) ungeladen abgespalten. Dennoch sind die bei der Gaschromatographie erhaltenen Peaks eindeutig zu identifizieren. So müßte es möglich sein, die Position des estergebundenen Phosphates im Lipid A direkt nach Methylierung mit der kombinierten GLC-MS-Analyse zu bestimmen.

Aber auch zur Untersuchung von Zuckerphosphaten in der Polysaccharidkette eignet sich diese Methode. So konnten Radziejewska-Lebrecht et al. (98) in

der Glukose-Heptose-Region des Kernoligosaccharides von LPS aus Proteus mirabilis mit dieser Methode Heptose-7-Phosphat identifizieren. Dazu wurde das Heptose-Phosphat aus dem Hydrolysat des Core-Oligosaccharides mit der Hochspannungspapierelektrophorese isoliert, nach Hakomori methyliert und auf einer CP-Sil-5-Kapillarsäule gaschromatographisch untersucht. Es erschienen zwei Peaks mit den relativen Retentionszeiten 1.88 und 1.94 (t_R Glukose-6-Phosphat = 1,00) mit einem Flächenverhältnis von etwa 1:4. Beide Peaks ergaben das gleiche Massenspektrum und entsprechen wahrscheinlich den beiden anomeren Formen des permethylierten Heptose-Phosphates.

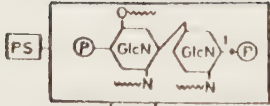
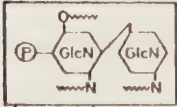
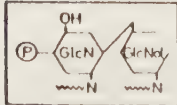
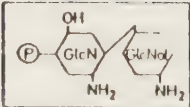
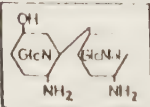
Die von einem Heptose-7-Phosphat zu erwartenden Primärfragmente $m/e = 139$ und 249 (aus der Spaltung der C_6/C_7 -Bindung) sind nur mit kleiner Intensität vorhanden. Dafür liegt das Ion $m/e = 183$ mit hoher Intensität vor (Spaltung der C_5/C_6 -Bindung). Wie aus den Versuchen mit Glukosamininitol-6-Phosphat und Glukosamininitol-5-Phosphat (Abb. 23) zu erkennen ist, findet eine Spaltung der C-C-Bindung nicht statt, wenn eines dieser C-Atome die Phosphatgruppe trägt. (So fehlt im Glukosamininitol-5-Phosphat das Fragment $m/e = 183$). Deshalb ist das mit hoher Intensität im Spektrum des Heptose-Phosphates vorhandene Fragment $m/e = 183$ ein weiteres starkes Indiz für ein Heptose-7-Phosphat.

4.1.8.2. Isolierung des Lipoid A-Rückgrats mit estergebundenem Phosphat

Nachdem gezeigt worden war, daß permethylierte Glukosamin-Phosphat-Derivate einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse zugänglich sind, sollte im Folgenden versucht werden, mit Hilfe dieser Methodik die Position des estergebundenen Phosphat-Restes im Lipoid A zu bestimmen. Da nur geringere Mengen an Yersinia LPS zur Verfügung standen, wurden diese Untersuchungen zunächst am Modell von Salmonella minnesota Re-LPS durchgeführt.

Tabelle 14: Schematisierter Abbauweg zur Herstellung des Lipoid A-Rückgrats mit dem ester gebundenen Phosphat und die dazugehörige chemische Analyse der Zwischenprodukte. Die analytischen Werte sind in Mol pro 2 Mol Glukosamin angegeben.

n.b. = nicht bestimmt.

	Glukosamin bestimmt mit der Morgan-Elson Reaktion			Glukosamin(itol) bestimmt mit dem Aminosäure- analysator		
	ohne Hy- drolyse	Mit Hy- drolyse	Phos- phat	P-GlcN	GlcN	GlcN ₀₁
	Mol/2 Mol GlcN					
 LPS	n.b.	2.00	1.96	0.50	1.31	0.00
↓ HCl  Lipid A	<u>1.03</u>	<u>2.00</u>	<u>1.12</u>	0.38	1.29	0.00
↓ NaBH ₄  Lipid A _{red}	0.00	1.00	0.88	0.31	0.43	0.40
↓ N ₂ H ₄  + 	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

LPS (100 mg) wurde mit 0.2 N HCl für 30 Min. bei 100°C behandelt, wobei freies Lipid A präzipitierte (Tab. 14). Die chemische Analyse von freiem Lipid A ergab, daß es frei von dOclA war und etwa 1 Mol organisches Phosphat (bezogen auf zwei Mol Glukosamin) enthält. Die Farbausbeute im direkten Morgan-Elson-Test entsprach etwa 1 Mol Glukosamin/2 Mol Gesamt-Glukosamin. Dies bedeutet, daß unter den gewählten Hydrolysebedingungen sowohl der Polysaccharidteil als auch der am C-Atom 1 des Lipid A-Rückgrats gebundene Phosphat-Rest weitgehend abgespalten werden. Somit entsprach die Zusammensetzung von Lipid A der in Tabelle 14 angegebenen Strukturformel.

Freies Lipid A wurde dann reduziert (57°C, siehe 6.2.1.1.2.), einer Hydrazinolyse unterworfen (19 h, siehe 6.2.1.2.) und das Hydrazinolysat über Hochspannungspapierelektrophorese aufgetrennt (siehe 6.2.4.3.). Bei Anfärbung mit Silbernitrat (Trevelyan) konnten 4 Substanzen sichtbar gemacht werden mit den Wanderungsgeschwindigkeiten $M_1 = 0.43$ (Fraktion 1), $M_2 = 0.73$ (Fraktion 2), $M_3 = 1.00$ (Fraktion 3) und $M_4 = 1.12$ (Fraktion 4) ($M_{\text{GlcN}} = 1.00$). Die einzelnen Fraktionen wurden eluiert (H_2O) und nach saurer Hydrolyse (4 N HCl, 10 h, 100°C) mit Hilfe des Aminosäureanalysators charakterisiert (Tab. 15).

Fraktion 4 ($M = 1.12$) konnte gemäß der Wanderungsgeschwindigkeit und aufgrund des Verhältnisses von Glukosamin zu Glukosaminitol (etwa 1:1) als ein reduziertes Glukosamin-Disaccharid identifiziert werden.

Fraktion 3 ($M = 1.00$) besteht nur aus Glukosaminitol. Dies ist offensichtlich durch saure Spaltung der β -1.6-Bindung des Lipid A-Rückgrats und anschließende Reduktion entstanden (siehe auch 4.1.3.3.).

Als Komponenten in Fraktion 2 ($M = 0.73$) konnte mit dem Aminosäureanalysator nur Glukosamin nachgewiesen werden. Die saure Hydrolyse vor der Untersuchung mit dem Aminosäureanalysator verändert oder spaltet aber offensichtlich die Substanz, denn die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Frak-

tion ist bei der Papierelektrophorese langsamer als die von reinem Glukosamin. Es muß sich hier also um ein substituiertes Glukosamin handeln. Die genaue Zusammensetzung von Fraktion 2 konnte bisher aber noch nicht geklärt werden.

Tabelle 15: Papierelektropherogramm der Fraktionen nach Hydrazinolyse von reduziertem Lipoid A. Angegeben sind Wanderungsgeschwindigkeiten, Ausbeuten und Analysenwerte.

		Wande- rungs- geschwin- digkeit $M_{\text{GlcN}} = 1.00$	Aus- beute (mg)	Zusammen- setzung*		
				P-GlcN	GlcN	GlcN _{ol}
				$\mu\text{Mol/mg}$		
Glukosamin		Fraktion 4, $M = 1.12$	1,3	0,00	0,78	0,62
		Fraktion 3, $M = 1.00$	0,5	0,00	0,03	0,30
		Fraktion 2, $M = 0,73$	0,7	0,00	0,34	0,00
		Fraktion 1, $M = 0,43$	1,2	0,13	0,34	0,42
Glukose						

* Die Analysen wurden mit dem Aminosäureanalysator durchgeführt (nach Hydrolyse mit 4 N HCl, 10 h, 100°C).

Die Analyse der hydrolysierten Fraktion 1 ($M = 0,43$) im Aminosäureanalysator zeigt, daß hier Glukosamin und Glukosaminitol in Verhältnis von 1:1 vorliegen, wobei der Glukosamin-Rest phosphoryliert ist. Der Phosphat-Rest läßt sich quantitativ mit alkalischer Phosphatase abspalten, wobei Fraktion 1 in Fraktion 4 (reduziertes Glukosamin-Disaccharid) überführt wird. Nach diesen Befunden liegt in Fraktion 1 das Glukosamin-Disaccharid mit einem am nicht reduzierenden Glukosamin estergebundenen Phosphat vor.

4.1.8.3. Methylierungsanalyse des Phosphoglukosaminyl- β -1.6-Glukosaminitol-Disaccharides

Das mit der Hochspannungspapierelektrophorese isolierte Phosphoglukosaminyl-Glukosaminitol-Disaccharid (Fraktion 1, 2,1 mg) wurde N-acetyliert (siehe 6.2.1.3.1.) nach Hakomori methyliert (siehe 6.2.1.7.) und gaschromatographisch untersucht. Leider wurde auch unter extremen Bedingungen (300°C Säulenofentemperatur) kein Peak erhalten. Es ist allerdings nicht sicher, ob dies darauf beruht, daß das Molekül aufgrund von Schwerflüchtigkeit sich nicht mehr für einen gaschromatographischen Nachweis eignet, oder ob zu geringe Mengen vorlagen. Da die Substanz aber gut gereinigt war, konnte die massenspektrometrische Untersuchung über einen Festkörpereinlaß durchgeführt werden. Anhand der Fragmente (Abb. 25) ist eindeutig zu erkennen, daß es sich um ein Phosphoglukosaminyl-1.6-Glukosaminitol Molekül handelt. Die Fragmente $m/e = 472$ und 440 ($472-32$) entstehen durch die Spaltung der C_3/C_4 -Bindung im Glukosaminitolteil des Moleküls und entsprechen den Fragmenten $m/e = 378$ und 346 ($378-32$) im nicht-phosphorylierten Glukosaminyl-Glukosaminitol Molekül (siehe 4.1.5.2.).

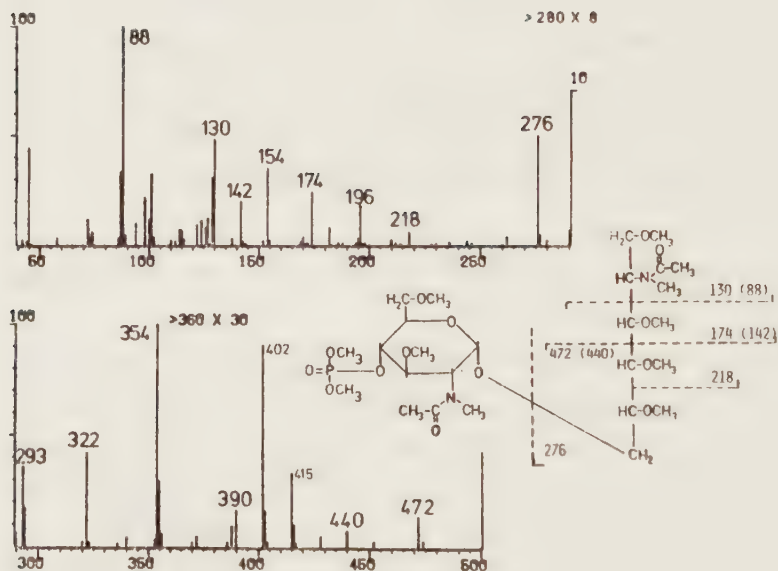


Abb. 25: Massenspektrum von N-acetyliertem, permethyliertem Phosphoglucosaminyl-Glukosaminitol, aus Salmonella minnesota.

Diese Fragmente sprechen somit für ein Phosphoglucosaminyl-Molekül, welches mit einer aus drei C-Atomen bestehenden Kette des Glukosaminitol-Teils verbunden ist. Der Glukosaminitolteil des Moleküls ist durch die Fragmente $m/e = 130$ (88), 174 (142), 218 und 276 gekennzeichnet. Die Anwesenheit des Fragmentes $m/e = 218$ (entstanden durch Spaltung der C₄/C₅-Bindung) ist, wie im Kapitel 4.1.5.2. gezeigt, ein Beweis für die 1,6-Bindung im Glukosamin-Disaccharid. Der Phosphoglucosaminyl-Teil des Moleküls ist durch die Fragmente $m/e = 354$, 322 (354-32), 293, 196 (322-126) und 154 (196-42) charakterisiert. Vergleicht man diese Fragmente mit dem

Spektrum von Glukosamin-6-Phosphat (Abb. 24), so fällt auf, daß das Fragment $m/e = 312$ ($354-42$) vollkommen fehlt, die Fragmente 322 ($354-32$) und 154 aber wesentlich größer sind. Für das Glukosamin-6-Phosphat ist das mit hoher Intensität vorkommende Fragment $m/e = 142$ (D-Serie) charakteristisch. Bei Glukosamin-4-Phosphat kann dies nicht vorkommen, da es die Phosphatgruppe trägt. Dieses Fragment $m/e = 142$ liegt im Falle des Phosphoglukosaminyl-Glukosaminitols nur in geringer Intensität vor. Wahrscheinlich stammt es zu 100% aus dem Glukosaminitol-Teil des Moleküls ($m/e = 174-32$).

Um die Position des estergebundenen Phosphates eindeutig zu beweisen, wäre also eine Reduktion des Lipoid A-Grundgerüsts mit Deuterium nötig. Außerdem sollte man die Fragmentierungen von reinem Glukosamin-4-Phosphat und -3-Phosphat kennen. Da an der Herstellung dieser Standardsubstanzen momentan gearbeitet wird, wurden weitere Untersuchungen zu diesem Problemkreis nicht durchgeführt.

4.1.9. Untersuchung von (phosphorylierten) Glukosamin-Disacchariden mit Hilfe des Aminosäureanalysators

In den bisherigen Analysen war der Gehalt an (phosphorylierten) Aminosackern in verschiedenen Lipoid A-Präparaten nach saurer Hydrolyse (4 N HCl, 10 h, 100°C) mit Hilfe des Aminosäureanalysators durchgeführt worden. Bei solchen Analysen trat neben den erwarteten Substanzen wie Glukosamin, Glukosamin-Phosphat, Glukosaminitol u.a. öfter ein Peak nach 74 Min. auf, von dem vermutet wurde, daß es sich um ein nicht-hydrolysiertes Glukosamin-Disaccharid handelte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine Reihe authentischer Standardsubstanzen präpariert und mit Hilfe des Aminosäureanalysators untersucht. So wurden unter anderem P-GlcN-GlcN , P-GlcN-GlcN_{01} , $(\text{GlcN})_2$, GlcN-GlcN_{01} (isoliert aus Salmonella minnesota Lipoid A) einzeln analysiert.

Tabelle 16: Identität und Retentionszeit von Glukosamin-Derivaten (reduzierte, nicht reduzierte, freie oder phosphorylierte Mono- und Disaccharide) im Chromatogramm des Aminosäureanalysators (siehe Abb. 26) erhalten mit dem Programm P₁.

Substanz	Nummer in Abb. 26	Retentionszeit
Unbekannter Peak	1	5'
Äthanolaminpyrophosphat	1	5'
Glukosaminphosphat	2	6' 30"
Glukosaminitolphosphat	2	6' 30"
Äthanolaminphosphat	2	6' 30"
4-Aminoarabinosephosphat	2	6' 30"
Serin	3	16' 30"
Glycin	4	27' 30"
Phosphoglukosaminyl- β-1.6-Glukosamin	5	33'-34'
Phosphoglukosaminyl- β-1.6-Glukosaminitol	6	38'-39'
Glukosamin	7	52'-30"
Glukosaminitol	8	56'-00"
Glukosaminyl- β-1.6-Glukosamin	9	70'
Lysin	10	73'
Glukosaminyl- β-1.6-Glukosaminitol	11	74' 30"
Äthanolamin	11	74' 50"
Ammoniak	12	76' 30"
unbekannter Peak	13	78'

4-Aminoarabinose ist in Abb. 26 nur gestrichelt dargestellt, da es mit dem Programm P₂ eluiert wird. Dort erscheint 4-Aminoarabinose nach 68 Minuten und 20 Sekunden.

Tabelle 16 gibt eine Zusammenstellung der verwendeten Substanzen mit den erhaltenen Retentionszeiten wieder. Außerdem enthält diese Tabelle noch eine Reihe anderer Aminogruppen tragende Moleküle, die im Lipoid A

vorkommen, sowie zum Vergleich einige authentische Standard-Substanzen (Serin, Glycin, Lysin, Ammoniak).

Es zeigte sich, daß sowohl freies als auch phosphoryliertes Glukosamin-Di-saccharid gut analysiert werden kann. Dabei werden die reduzierten Formen von den nicht reduzierten abgetrennt.

Auf diese Weise sind die Fraktionen nach der Hochspannungspapier-elektrophorese mit kleinen Mengen bequem zu bestimmen. Außerdem ist leicht zu erkennen, ob und wieviel nicht reduziertes Material vorliegt, was nach saurer Hydrolyse nicht so eindeutig festzustellen ist.

Abbildung 26 zeigt das Chromatogramm eines Gemisches der in Tabelle 16 aufgeführten Ninhydrin-positiven Lipoid A-Bestandteile.

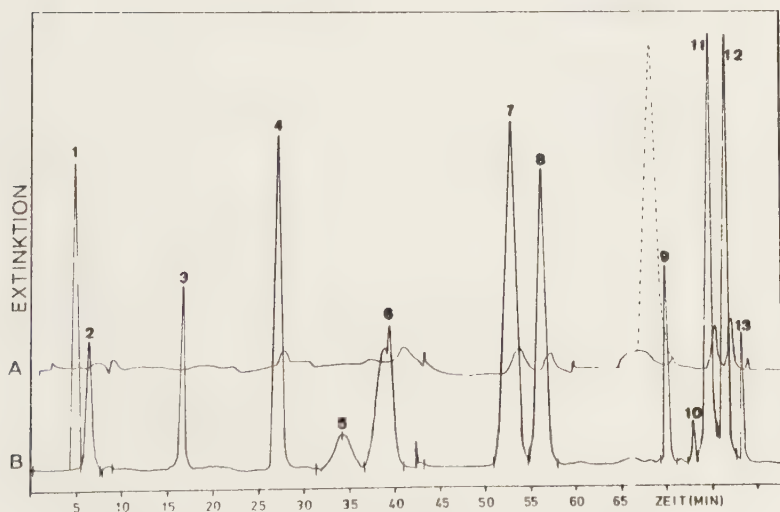


Abb. 26: Chromatogramm des Aminosäureanalysators mit dem Programm P-I (siehe 6.2.4.4.). Die Extinktionen wurden bei A) 440 nm und B) 590 nm gemessen. Die Identität der einzelnen Peaks und deren Retentionszeiten sind aus Tabelle 16 zu entnehmen.

4.1.10. Bestimmung der Phosphat-Substituenten im Lipoid A-Grundgerüst

4.1.10.1. Bestimmung des Substituenten der estergebundenen Phosphat-Gruppe

Wie von Volk et al. (126) erstmals gefunden wurde, enthält das LPS von Salmonella minnesota (Wild S- und R-Stämme) L-4-Aminoarabinose (41,83). Später wurde von Hase und Rietschel für Chromobacterium violaceum (43), Mühlradt et al. für Salmonella minnesota (83), Sidorczyk et al. für Proteus mirabilis (138) und Tharanathan et al. für Rhodospirillum tenue (124) gezeigt, daß L-4-Aminoarabinose die estergebundene Phosphatgruppe im Lipoid A substituiert (Tab. 1). Die folgenden Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, nachzuweisen, ob L-4-Aminoarabinose auch Bestandteil von Yersinia enterocolitica Lipoid A ist.

4.1.10.1.1. Identifizierung von L-4-Aminoarabinose in Yersinia LPS

LPS (Y.enterocolitica 490 M, 75 R, 161-45a) wurde mit HCl (0.02 HCl, 100°C, 15 Min. oder 0.5 N HCl, 37°C, 15 h) behandelt. Bei der Untersuchung des Überstandes dieses Hydrolysates mit der Hochspannungspapier-elektrophorese, erschien nach Anfärbung mit Ninhydrin ein gelber Fleck ($M_{\text{GlcN}} = 1.20$), der sich in Farbe und Wanderungsgeschwindigkeit wie authentische L-4-Aminoarabinose ($M_{\text{GlcN}} = 1.18$) verhielt. Im Aminosäure-analysator (siehe 6.2.4.4.) eluierte das Material mit dem Programm P₂ ebenso wie authentische L-4-Aminoarabinose nach 68 Minuten und 20 Sekunden (Abb. 26). Das Verhältnis der Extinktionen (440 nm/590 nm) betrug dabei 5:1. Damit war deutlich, daß Yersinia enterocolitica auch L-4-Aminoarabinose enthält. In der Re-Mutante (Y.enterocolitica 161-45a) war dieser Aminosucker allerdings nicht vorhanden.

Um die Identität der 4-Aminoarabinose zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Identifizierung mit der GLC-MS-Analyse durchgeführt. Dazu wurde N-acety-

liertes LPS mit 0.02 N HCl 15 Minuten bei 100°C hydrolysiert, und die im Überstand befindlichen Monosaccharide nach der Methode von Sawardecker (siehe 6.2.1.4.) in die Alditolacetate überführt. Bei der anschließenden gaschromatographischen Untersuchung erschien nur ein Peak mit einer relativen Retentionszeit von 1.34 (innerer Standard: α -Methyl-Glukosaminid = 1.00). Diese Retentionszeit ist identisch mit der für authentisches peracetyliertes L-4-Aminoarabinitol.

Das Massenspektrum dieses Peaks (Abb. 27) zeigte unter anderem die Fragmente $m/e = 288, 246$ ($288-32$), 228 ($288-60$), $217, 145, 144$ und 102 ($144-32$). Damit ist es dem von peracetyliertem Glukosaminitol sehr ähnlich. Aufgrund der Retentionszeit und dieses Massenspektrums kann der Peak aber eindeutig als peracetyliertes L-4-Aminoarabinitol identifiziert werden.

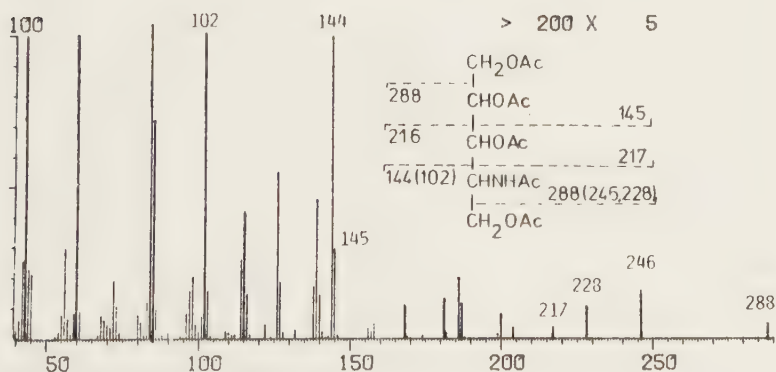


Abb. 27: Massenspektrum von peracetyliertem L-4-Aminoarabinitol aus Yersinia enterocolitica

4.1.10.1.2. Semiquantitative Bestimmung von L-4-Aminoarabinose

Die oben beschriebene gaschromatographische Untersuchung ermöglichte nicht nur eine Charakterisierung, sondern gleichzeitig eine semiquantitative Bestimmung der L-4-Aminoarabinose. Es wurden für den Stamm Y. enterocolitica

colitica 490 M, 0.15 Mol und für 75 R 0.37 Mol L-4-Aminoarabinose pro 2 Mol Glukosamin gefunden. Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse des Überstandes nach saurer Hydrolyse von LPS im Aminosäureanalysator (0.11 und 0.29 Mol/2Mol GlcN). L-4-Aminoarabinose ist also im Falle von Yersinia enterocolitica 490 M und 75 R nicht in molaren Mengen vorhanden, sondern substituiert zwischen 20 und 40% das Lipoid A-Grundgerüst.

4.1.10.1.3. Bestimmung der Bindungsstelle von L-4-Aminoarabinose am Lipoid A-Rückgrat

In allen Lipoid A-Präparaten, bei denen bisher L-4-Aminoarabinose gefunden wurde, ist diese ein Substituent des ester gebundenen Phosphates (Tab. 1). In diesen Fällen läßt sich mit Alkali L-4-Aminoarabinose-1-Phosphat vom Lipoid A-Rückgrat abspalten. Um zu prüfen ob dies auch bei Yersinia enterocolitica der Fall ist, wurde LPS (20 mg) mit Natronlauge (0.2 N NaOH, 1 h, 100°C) behandelt und die abgespaltenen Produkte durch Dialyse von entstandenem LPS-OH abgetrennt. Bei der hochspannungspapier-elektrophoretischen Untersuchung des Dialysates konnte an der Auftragstelle eine Ninhydrin-positive Substanz nachgewiesen werden. Im Aminosäureanalysator zeigt diese Substanz eine Retentionszeit von 6 Minuten und 30 Sekunden. Diese Zeit ist charakteristisch für Phosphatderivate von Glukosamin, Glukosaminitol, Äthanolamin und L-4-Aminoarabinose. Die Substanz wurde deshalb einer Phosphatasebehandlung unterworfen und erneut mittels Hochspannungspapier-elektrophorese und dem Aminosäureanalysator analysiert. Es wurde jeweils eine Komponente identifiziert, die charakteristische Merkmale von L-4-Aminoarabinose aufwies (in der HVPE $M_{\text{GlcN}} = 1.18$, Gelbfärbung bei Anfärben mit Ninhydrin, im Aminosäureanalysator Elution nach 68 Minuten und 20 Sekunden mit P_2). Es liegt also im Yersinia enterocolitica Lipoid A auch alkalilabiles L-4-Aminoarabinosephosphat vor. Deshalb ist anzunehmen, daß auch in diesem Fall die 4-Aminoarabinose den ester gebundenen Phosphatrest substituiert.

4.1.10.2. Untersuchung zur Frage ob der glykosidisch gebundene Phosphat-Rest einen Substituenten trägt

Bei der Untersuchung des Dialysates nach alkalischer Hydrolyse von LPS (0.2 N NaOH, 1 h, 100°C) fällt im Aminosäureanalysator ein unbekannter Peak auf (0.04 Mol/2 Mol GlcN), der eine ähnliche Retentionszeit wie Äthanolaminpyrophosphat besitzt ($t_R = 5$ Min., Peak 1, Abb. 26). Zusätzlich sind größere Mengen Glycin vorhanden (0.13 Mol/2 Mol GlcN). Nach schwach saurer Hydrolyse (0.02 HCl, 15 Min., 100°C) liegt der unbekannte Peak ($t_R = 5$ Min.) in größerer Menge vor (0.09 Mol/2 Mol GlcN), während der dem Glycin entsprechende Peak kleiner ist (0.03 Mol/2 Mol GlcN). Trennt man den Überstand nach saurer Hydrolyse mit der Hochspannungspapierelektrophorese, so zeigt die unbekannte Substanz eine Wanderungsgeschwindigkeit von $M = 0.22 M_{\text{GlcN}} = 1.00$. Äthanolaminpyrophosphat dagegen verhält sich wie eine saure Substanz (siehe Mühlradt 77). Außerdem konnte im LPS von Yersinia enterocolitica kein Äthanolamin nachgewiesen werden. Aufgrund der Eigenschaften bei der Hochspannungspapierelektrophorese und im Aminosäureanalysator kann man auf eine Substanz schließen, die sowohl eine basische (Amino-) als auch eine saure Gruppe tragen muß. Alkalische Phosphomonoesterase verändert allerdings nichts an dem unbekannten Peak. Aufgrund der geringen Mengen (höchstens 0.1 Mol/2 Mol GlcN) sind weitere Analysen der unbekannten Substanz nicht durchgeführt worden.

Ob Glycin ein Bestandteil von Lipoid A ist und mit der unbekannten Substanz in Zusammenhang steht, konnte nicht geklärt werden. Auffallend waren allerdings die umgekehrt proportional vorhandenen Mengen von Glycin und der unbekannten Substanz nach alkalischer und saurer Hydrolyse. Falls die unbekannte Substanz tatsächlich ein Substituent des glykosidisch gebundenen Phosphates sein sollte, so wäre dieses immer noch zu über 90% unbesetzt. Der weitaus größere Teil dieses Phosphates wäre also im Falle von Yersinia enterocolitica frei, d.h. nicht substituiert.

4.1.11. Fettsäuren

Der lipoidale Charakter von Lipid A wird durch langkettige Fettsäuren bedingt, mit denen das Glukosamin-Rückgrat substituiert ist. Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung einer größeren Zahl bakterieller LPS verschiedener Herkunft haben ergeben, daß die Hydroxylgruppen des Glukosamin-Rückgrats mit verschiedenen Typen von Fettsäuren besetzt sind. Im allgemeinen kommen geradzahlige, gesättigte, nicht hydroxylierte, sowie geradzahlige, gesättigte D-3-Hydroxyfettsäuren vor. Im Gegensatz dazu liegt in Amidbindung nur ein Typ von Fettsäuren vor, nämlich D-3-Hydroxyfettsäuren (Tab. 2).

4.1.11.1. Analyse der Gesamtfettsäuren

Zur Bestimmung der Gesamtfettsäuren (siehe 6.2.3.3.) wurde das LPS von Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a zunächst mit Säure (4 N HCl, 4 Stunden, 100°C) und anschließend mit Lauge (1 N KOH, 1 Stunde, 100°C) hydrolysiert. Nach Veresterung mit Diazomethan wurden die Fettsäure-Methylester gaschromatographisch untersucht (SE-30, 10%, 180°C).

Zwei Hauptpeaks waren zu erkennen, welche anhand der relativen Retentionszeiten als Laurinsäure- und Myristinsäuremethylester identifiziert werden konnten. Außerdem waren noch geringe Mengen 2-Hydroxylaurin-, Palmitin-, Myristin- und Δ^2 -Myristinsäure vorhanden. Die Identität von 2-Hydroxylaurinsäure wurde anhand eines Massenspektrums an den Fragmenten $m/e = 230$ (M), 171 (M-59) und 90 ($^+CH_2OHCOOCH_3$) sichergestellt. Sie kam allerdings nur in den Stämmen 490 M und 75 R in kleiner Menge vor. Die genauen Gesamtfettsäuremengen der drei untersuchten Yersinia enterocolitica Stämme sind in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 17: Gesamtfettsäuremuster der Yersinia enterocolitica Stämme 490 M, 75 R und 161-45a

Lipopolysaccharid aus <u>Yersinia enterocolitica</u>	Gesamtfettsäuren					
	12:0	14:0	Δ^2 -14:1	3-OCH ₃ -14:0	3-OH-14:0	3-OH-14:0 (Gesamt)**
Mol pro 2 Mol Glukosamin						
490 M*	1.17	0.16	0.43	-----	2.22	2.65
75 R*	0.68	0.92	0.32	-----	2.32	2.64
161-45a	0.13	0.52	0.22	-----	2.46	2.68
					0.08	4.05
					0.10	4.34
					0.17	3.50
						26.2
						25.3
						34.3

* Yersinia enterocolitica 490 M und 75 R enthalten zusätzlich noch geringe Mengen 2-Hydroxylaurinsäure

** 3-OH-14:0 (Gesamt) ist die Summe aus 3-OH-14:0 und den Artefakten Δ^2 -14:1 und 3-OCH₃-14:0

*** Gewichtsprozentage bezogen auf LPS.

Tabelle 18: Muster der estergebundenen Fettsäuren* in den Stämmen Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a

Lipopolysaccharid aus <u>Yersinia enterocolitica</u>	Estergebundene Fettsäuren						
	12:0	14:0	Δ^2 -14:1	3-OCH ₃ -14:0	3-OH-14:0	3-OH-14:0 (Gesamt-)**	%***
Mol pro 2 Mol Glukosamin							
490 M a)	0.43	0.12	0.12	0.39	0.62	1.13	11.3
	1.16	0.12	0.12	0.40	0.82	1.34	17.4
75 R a)	0.13	0.62	0.08	0.22	0.66	0.96	10.4
	0.48	0.68	0.07	0.23	0.86	1.16	14.1
161-45a a)	0.05	0.29	---	---	0.60	0.60	10.2
	0.10	0.42	---	---	0.89	0.89	15.2

* Die estergebundenen Fettsäuren wurden mit Natriummethylat freigesetzt und a) direkt und b) nach Behandlung mit Diazomethan gaschromatographisch untersucht.

** 3-OH-14:0 (Gesamt-) ist die Summe aus 3-OH-14:0 und den Artefakten Δ^2 -14:1 und 3-OCH₃-14:0

*** Gewichtsprozent bezogen auf LPS.

4.1.11.2. Analyse der estergebundenen Fettsäuren

Um zwischen ester- und amidgebundenen Fettsäuren differenzieren zu können, wurde das LPS zunächst einer alkalischen Methanolyse (NaOCH_3 , 20°C) unterworfen (siehe 6.2.3.4.). Es findet dabei eine Umesterung der estergebundenen Fettsäuren statt, wobei diese als Methylester freigesetzt werden und so direkt gaschromatographisch (SE-30, 10%, 180°C) untersucht werden können (Abb. 28). Die ermittelten Mengen an estergebundenen Fettsäuren sind aus Tabelle 18 zu ersehen.

In allen drei Stämmen liegen die bei der Gesamtfettsäurebestimmung gefundenen Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure quantitativ in Esterbindung vor. Außerdem ist etwa 1 Mol 3-Hydroxymyristinsäure estergebunden (knapp 3 Mol in der Gesamtfettsäurebestimmung, Tab. 17). Zwei Artefakte dieser Hydroxysäure, die 3-Hydroxymyristinsäure (Peak 6 in Abb. 28) und die Δ^2 -Myristinsäure (Peak 5 in Abb. 28) sind aber auffallender Weise nur in den Stämmen 490 M und 75 R zu finden. Außerdem ist in den Chromatogrammen beider Stämme ein unbekannter Peak (Peak 2 in Abb. 28) vorhanden, dessen Retentionszeit nur wenig größer als die von Laurinsäuremethylester (Peak 1 in Abb. 28) ist.

Nach zusätzlicher Diazomethanbehandlung der Proben verschwindet der Peak 2, wobei die Menge an Laurinsäuremethylester deutlich ansteigt (Tab. 18). Dies deutet darauf hin, daß der unbekannte Peak freie Laurinsäure darstellt. Ein Massenspektrum des unbekannten Peaks bestätigt diese Annahme (Abb. 29).

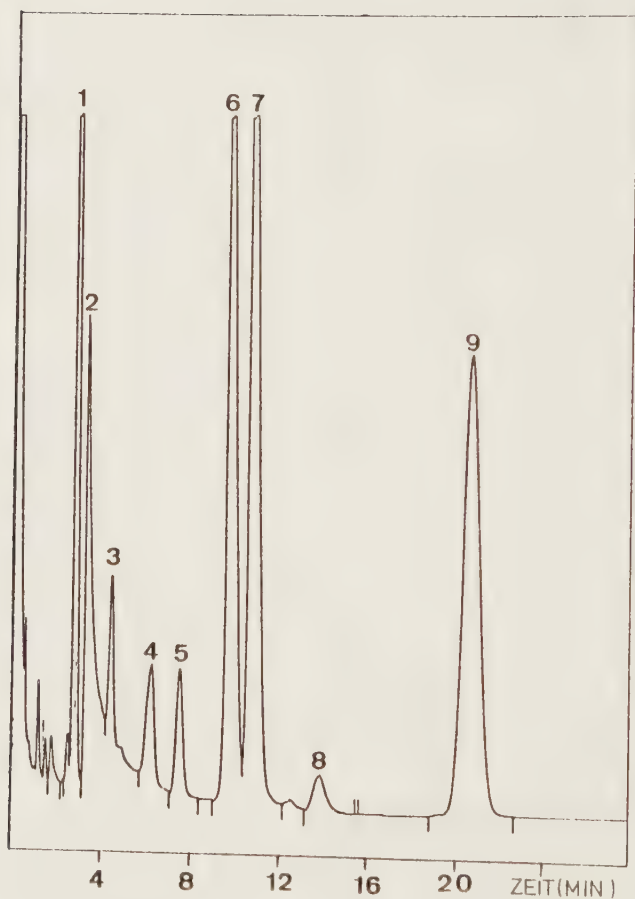


Abb. 28: Gaschromatogramm der estergebundenen Fettsäuren von *Yersinia enterocolitica* 75 R nach Freisetzung mit Methylat. (SE-30, 10%, 180°C).

- Peak 1 = Laurinsäuremethylester
- Peak 2 = Freie Laurinsäure
- Peak 3 = 2-OH-Laurinsäuremethylester
- Peak 4 = Myristinsäuremethylester
- Peak 5 = Δ^2 -Myristinsäuremethylester
- Peak 6 = 3-Methoxy-Myristinsäuremethylester
- Peak 7 = 3-OH-Myristinsäuremethylester
- Peak 8 = Palmitinsäuremethylester
- Peak 9 = Heptadecansäuremethylester (innerer Standard)

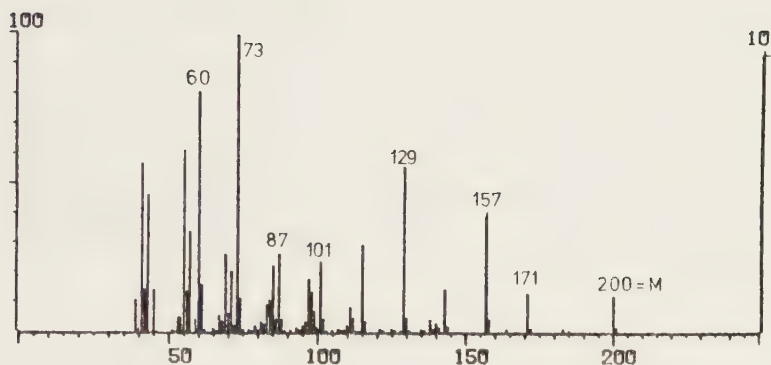


Abb. 29: Massenspektrum von freier Laurinsäure (Peak 2 in Abb. 28).

Der Molekularpeak von $m/e = 200$ und die Fragmente, die bei Abspaltung je eines Kettengliedes entstehen (z.B. $m/e = 171, 157, 143, 129$ ect.) sind deutlich vorhanden. Überraschend an diesem Ergebnis war zum einen die Tatsache, daß auch freie Fettsäuren auf einer sehr apolaren Säule wie der SE-30 einen sauberen Peak mit nur leichtem Tailing erzeugen. Zum anderen war zusätzlich die Herkunft freier Laurinsäure unklar. Eine Untermethylierung war unwahrscheinlich, da andere Fettsäuren nur einen Peak ergaben. So nahmen wir an, daß die freie Laurinsäure durch β -Eliminierung entstanden war.

Es ist bekannt, daß Natriummethylat eine β -Eliminierung an 3-Hydroxyfettsäuren katalysiert, wenn diese an ihrer Hydroxylgruppe eine Fettsäure tragen (101,107). Dabei wird der Substituent als freie Fettsäure eliminiert, und aus

der 3-Hydroxyfettsäure entsteht der entsprechende Δ^2 -ungesättigte Fettsäuremethylester. Die Δ^2 -ungesättigte Fettsäure wird anscheinend durch einen nukleophilen Angriff von Methylat in die 3-Methoxyfettsäure überführt. Die eliminierte Fettsäure kann nach Veresterung mit Diazomethan gaschromatographisch erkannt werden. Die geschilderten Ergebnisse deuten also darauf hin, daß in den Stämmen 490 M und 75 R estergebundene 3-Hydroxymyristinsäure (teilweise) mit Laurinsäure substituiert ist. Um dies eindeutig nachzuweisen, wurde versucht Lauroxymyristinsäure zu isolieren und mit der GLC-MS-Analyse zu charakterisieren.

4.1.11.3. Isolierung des Lauroxymyristinsäuremethylesters

Da die Esterbindung zur Hydroxylgruppe alkalilabil ist, wurde für die Isolierung der Lauroxymyristinsäuregruppe eine milde Alkalibehandlung angewandt. Dazu wurde LPS (100 mg) mit schwacher Lauge (0.25 N NaOH) für nur 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Extraktion mit Chloroform und Veresterung mit Diazomethan wurden die freien Fettsäuren mit der kombinierten GLC-MS-Analyse untersucht (siehe 6.2.3.7.).

Das Gaschromatogramm (OV-1, 220°C) zeigte nur einen Peak mit der relativen Retentionszeit $R_t = 0.619$ (R_t Myristoximyristinsäuremethylester = 1.00). Das Massenspektrum (Abb. 30) zeigte unter anderen die Fragmente $m/e = 241$ und 257, charakteristisch für den Myristoxyrest, und $m/e = 183$ ($C_{11}H_{25}^+-C=O$), ein Fragment, das auf Laurinsäure als Substituenten der 3-Hydroxygruppe hindeutet. Im Falle des Myristoxy-Myristinsäuremethylesters ist das Fragment $m/e = 211$ ($C_{13}H_{28}^+-C=O$) typisch für Myristinsäure als Substituenten (37,138).

Aus diesen Daten geht eindeutig hervor, daß im Lipid A von Yersinia enterocolitica 490 M und 75 R etwa 30-50% der estergebundenen 3-Hydroxymyristinsäure mit Laurinsäure substituiert sind.

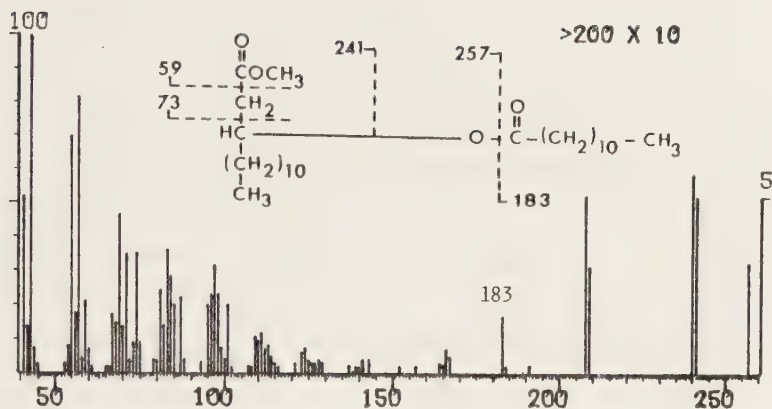


Abb. 30: Massenspektrum von Lauroxymyristinsäuremethylester der vom Lipid A aus Yersinia enterocolitica 75 R isoliert wurde.

4.1.11.4. Analyse der amidgebundenen Fettsäuren

Das Sediment nach der Methanolyse von LPS repräsentiert O-deacyliertes LPS (LPS-OH), das noch die amidgebundenen Fettsäuren trägt. Um diese quantitativ zu erfassen, wurde LPS-OH zunächst sauer und anschließend alkalisch hydrolysiert (siehe 6.2.3.5.). Nach Extraktion mit Chloroform und Veresterung mit Diazomethan wurden die Fettsäuren als Methylester gaschromatographisch bestimmt (SE-30, 10%, 180°C).

In den Chromatogrammen aller drei untersuchten Yersinia enterocolitica Stämme wurden zwei Hauptpeaks gefunden, die sich in ihren Retentionszeiten wie authentische Δ^2 -Myristinsäuremethylester ($t_R = 7.8$ min.) und 3-Hydroxymyristinsäure ($t_R = 11.9$) verhalten. Dieses Ergebnis zeigt, daß 3-Hydroxymyristinsäure amidgebunden ist. Die quantitative Analyse ergab etwa 2 Mol

pro Glukosamin-Disaccharid. Wie Wollenweber (135) zeigte, ist Δ^2 -Myristinsäure bei saurer Hydrolyse von 3-Hydroxymyristinsäure immer zu erwarten (Wasserabspaltung). Quantitative Untersuchungen ergaben, daß unter den gewählten Hydrolysebedingungen etwa 15% der 3-Hydroxymyristinsäure dehydratisiert werden (135). Im Falle von Yersinia enterocolitica LPS liegen aber 25% Δ^2 -Myristinsäuremethylester vor. Dies deutet darauf hin, daß diese zum Teil durch β -Eliminierung entstanden ist. Damit wäre, wie in Salmonella (135) die Hydroxylgruppe der amidgebundenen 3-Hydroxymyristinsäure (teilweise) substituiert.

4.1.11.5 Bestimmung der absoluten Konfiguration der 3-Hydroxymyristinsäure (105)

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der 3-Hydroxymyristinsäure in Yersinia enterocolitica LPS wurde folgendermaßen vorgegangen (siehe 6.2.3.6.): LPS (161-45a) wurde alkalisch (4 N KOH, 5 h, 100°C) hydrolysiert, und die freigesetzte 3-Hydroxymyristinsäure mit Bortrifluorid-Diäthylätherat/Diazomethan in den 3-Methoxymyristinsäuremethylester überführt. Nach Verseifung mit Alkali (0.1 N NaOH, 60°C, 1 h) wurde die freie 3-Hydroxymyristinsäure dünnschichtchromatographisch abgetrennt, in das Säurechlorid überführt (mit SOCl_2) und mit L-Phenyläthylamin umgesetzt. Das entstandene Diastereomere 3-Methoxymyristinsäure-L-Phenyläthylamid wurde gaschromatographisch untersucht (OV-1, 220°C). Es weist die gleiche Retentionszeit wie D-3-Methoxymyristinsäure-L-Phenyläthylamid auf ($t_R = 21.6$, L-3-Methoxymyristinsäure-L-Phenyläthylamid eluiert bei $t_R = 24.9$). Dies zeigt, daß die 3-Hydroxymyristinsäure im Lipid A von Yersinia enterocolitica die D-Konfiguration besitzt.

4.1.11.6. N- und O-Acetylbestimmung

Nach der Methode von Fromme und Beilharz (19) wurden im LPS von Yersinia enterocolitica 490 M, 75 R und 161-45a Acetylgruppen bestimmt (siehe 6.2.3.9.). Im Stamm 490 M wurden 2.1% N-Acetyl gefunden. Da die Amino-
gruppen des Lipoid A-Rückgrats quantitativ mit 3-Hydroxymyristinsäure substituiert sind, müssen sich diese Acetylgruppen im Polysaccharidteil befinden. Im LPS der Stämme 75 R und 161-45a konnten Acetylgruppen nicht nachgewiesen werden.

4.2. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.2.1. Untersuchungen der Kreuzreaktion des LPS aus Yersinia enterocolitica 161-45a mit Salmonella Lipoid A

Die Immunisierung von Säugetieren mit Bakterien oder reinem Lipopolysaccharid bewirkt die Entstehung von Antikörpern, die vorwiegend gegen die O-spezifische Seitenkette gerichtet sind. Es können aber auch Antikörper gegen Lipoid A gebildet werden. Erst kürzlich stellten Galanos et al. (22) Antiseren gegen die Lipoid A-Komponente von Lipopolysacchariden her. Mit diesem Anti-Lipoid A-Antiserum ist es nun möglich, die serologischen Kreuzreaktionen verschiedener Lipoid A mit Salmonella Lipoid A zu demonstrieren. Zu diesem Zweck sind zwei Testsysteme entwickelt worden: a) Der Test der passiven Hämolysen (in vitro) und b) der Pyrogentest mit Kaninchen (in vivo).

4.2.1.1. Test der passiven Hämolysen mit Lipoid A-OH aus Yersinia enterocolitica 161-45a

Bei diesem Test werden Schafserythrozyten mit dem Antigen (Lipoid A-OH aus Yersinia enterocolitica) beladen und in Gegenwart von Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum und Komplement inkubiert (siehe 6.3.2.6.). Falls das zu testende Antigen mit Salmonella Lipoid A kreuzreagiert, tritt eine Lyse der mit Antigen beladenen Erythrozyten auf. Das Lipoid A-OH von Yersinia enterocolitica bewirkte eine Lyse bis zu einer Antiserumverdünnung von 1:2000. Bei dem gleichen Antiserum trat mit Lipoid A-OH aus Salmonella minnesota R 595 eine Lyse bis zu einer Antiserumverdünnung zwischen 1:2000 und 1:4000 auf.

4.2.1.2. Test der Hämolysehemmung mit Lipoid A-OH aus Yersinia enterocolitica 161-45a

Beim Hämolysehemmtest (siehe 6.3.2.7.) wird das Hämolyse-System gehemmt, indem das Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum mit Yersinia Lipoid A-OH vorinkubiert wird. Bei vorhandener Kreuzreaktion reagiert das heterologe Lipoid A-OH mit den Anti-Lipoid A-Antikörpern, sodaß nach Zugabe der Erythrozyten (beladen mit Salmonella Lipoid A-OH = homolog, mit Yersinia Lipoid A-OH = heterolog) keine Lyse eintritt. Im homologen System wurde die Lyse noch von 0.003 µg und im heterologen System von 0.002 µg Yersinia Lipoid A-OH gehemmt (Salmonella, 0.001 µg).

4.2.1.3. Untersuchung der spezifischen Absorption von Lipoid A-Antikörpern

Die Spezifität des Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserums gegen Yersinia Lipoid A wurde auch durch Absorptionsversuche (siehe 6.3.2.4.) analysiert. Dazu belädt man Schafserythrozyten mit Yersinia Lipoid A und inkubiert diese mit dem Antiserum. Im anschließenden Test der passiven Hämolyse zeigte das Serum keine Aktivität mehr, was bedeutet, daß alle Antikörper durch das Yersinia Lipoid A absorbiert waren.

Diese Ergebnisse der serologischen Untersuchungen zeigen deutlich, daß eine Kreuzreaktion zwischen dem Lipoid A-OH von Salmonella und dem von Yersinia enterocolitica besteht. Leider können der Hämolyse- und der Hämolysehemmtest nur mit freiem Lipoid A durchgeführt werden. Um dieses herzustellen ist aber eine saure Hydrolyse von LPS notwendig, bei der eventuell schon Substituenten abgespalten werden können, die sonst eine Kreuzreaktion verhindern könnten. Deswegen untersuchten wir die Kreuzreaktion auch im Pyrogentest mit Kaninchen (in vivo).

4.2.1.4. Pyrogentest mit Kaninchen auf Lipoid A-Kreuzreaktionen

Bei diesem Test kann sowohl freies als auch gebundenes Lipoid A (wie es im LPS vorliegt) auf Kreuzreaktionen hin untersucht werden (102,103,106). Dafür werden Kaninchen mit einer pyrogenen Dosis von LPS oder Lipoid A am Tage 0 vorbehandelt. Am Tag 2 erhalten sie dann Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum und eine Stunde später wiederum eine pyrogene Dosis LPS oder Lipoid A (siehe 6.3.1.). Wenn eine serologische Kreuzreaktion zwischen dem Pyrogen und dem Salmonella-Lipoid A besteht, ist die Fieberreaktion am Tag 2 unterdrückt.

Um die Fiebertests durchführen zu können, wurde zunächst die kleinste Dosis, welche drei Stunden nach der Injektion ein gutes Fieber erzeugt (MPD₃), ermittelt.

4.2.1.4.1. Bestimmung der MPD-3 von Yersinia enterocolitica LPS

Die Stärke der Pyrogenität eines Stoffes kann man bestimmen, indem man die kleinste Dosis ermittelt, welche drei Stunden nach der i.v. Injektion einen Temperaturanstieg von 0,6°C bewirkt (MPD-3, 102). Um Fieberkurven in vernünftigen Temperaturbereichen zu bekommen, ist es nötig, diese MPD-3 zu kennen. Dazu wurden drei Gruppen von je 4 Kaninchen mit drei verschiedenen Konzentrationen von Yersinia enterocolitica 161-45a LPS gespritzt. Die durchschnittliche Temperatursteigerung drei Stunden nach der Injektion, aufgetragen gegen den Logarithmus der Konzentration von LPS, ergab für Yersinia enterocolitica 161-45a LPS eine MPD-3 von 0,01 µg/kg.

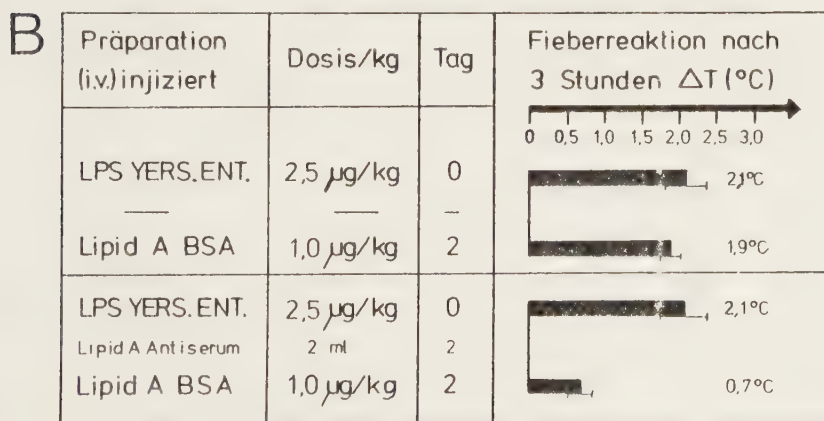
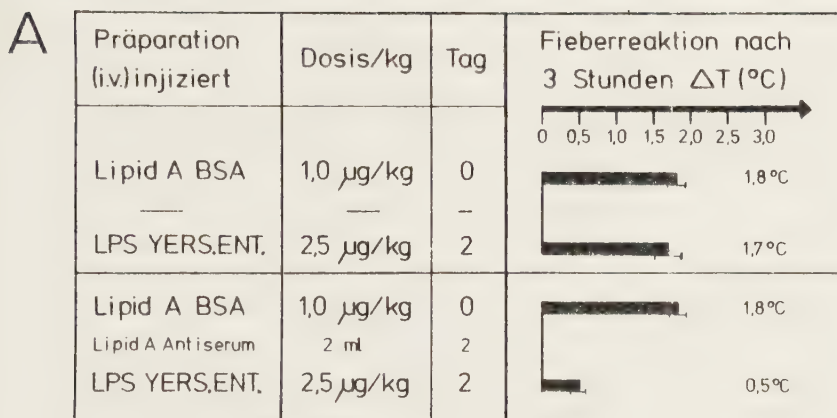


Abb. 31: Kreuztoleranz durch Lipoid A-Antiserum (*Salmonella*) bei von Lipopolysacchariden (*Yersinia enterocolitica* 161-45a) induziertem Fieber. Gezeigt sind die Fieberreaktionen ($T-3$) auf *Yersinia enterocolitica* Lipopolysaccharide (Tag 2, 100 MPD-3/kg, i.v.) bei Kaninchen, die am Tag 0 mit *Salmonella* Lipoid A-BSA (100 MPD-3/kg., i.v.) vorbehandelt waren (A), und die Fieberreaktionen bei der umgekehrten Versuchsanordnung, bei der mit *Yersinia enterocolitica* LPS vorbehandelt (Tag 0) und mit *Salmonella* Lipoid A-BSA zum zweiten Mal (Tag 2) eine fiebererzeugende Dosis gegeben wurde (B). Bei beiden Versuchen wurden jeweils 50% der Kaninchen 1 Stunde vor der zweiten Pyrogengabe (Tag 2) 2 ml Lipoid A-Antiserum (*Salmonella*) gespritzt.

4.2.1.4.2. Untersuchung auf Kreuzreaktion zwischen Yersinia enterocolitica und Salmonella Lipoid A mit dem Fiebertest

Zwei Gruppen von je vier Kaninchen wurden mit einer hundertfachen MPD-3 (1.0 µg/kg) von Salmonella Lipoid A-BSA vorbehandelt. Am Tag 2 wurden beiden Gruppen 2.5 µg/kg LPS von Yersinia enterocolitica gespritzt, wobei eine Gruppe vorher Salmonella Lipoid A-Antiserum erhalten hatte. Ohne Antiserum erzeugte das Yersinia LPS wieder einen Temperaturanstieg von 1.6-1.8°C, während bei den anderen Kaninchen durch das Antiserum das Fieber unterdrückt wurde (Abb. 31A). Auch bei der umgekehrten Versuchsanordnung, wenn die Kaninchen mit Yersinia enterocolitica LPS vorbehandelt sind, wird das von Lipoid A-BSA erzeugte Fieber am Tag 2 durch das Antiserum unterdrückt. Diese Versuche zeigen deutlich, daß auch an das Polysaccharid gebundenes, unverändertes Lipoid A von Yersinia enterocolitica im in vivo Test mit Salmonella Lipoid A kreuzreagiert.

5. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Untersuchungen der Lipopolysaccharide (LPS) gram negativer Bakterien sind von großem Interesse, da diese Komponente der bakteriellen Oberfläche die O-antigenen Eigenschaften in sich trägt, Rezeptoren für die Bakteriophagen darstellt, in höheren Organismen eine Vielzahl endotoxischer Reaktionen hervorruft und von Bedeutung für die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran ist. Dabei bestimmt die Polysaccharidkette die serologische O-Spezifität und die Phagenrezeptoreigenschaften, während der Lipoid-Teil (Lipoid A) zur Verankerung des Moleküls in der Bakterienmembran dient und für die endotoxischen Eigenschaften verantwortlich ist. Untersuchungen zur chemischen Struktur haben ergeben, daß Lipoid A aus verschiedenen gram negativen Bakterien bis auf wenige Ausnahmen (Rhodopseudomonas viridis, Rhodopseudomonas palustris (110), Pseudomonas diminuta und Pseudomonas vesicularis (141), Abb. 6) nach dem gleichen architektonischen Prinzip aufgebaut ist. Lipoid A besteht aus einem β -1,6 gebundenen D-Glukosamin-Disaccharid (= Lipoid A-Rückgrat), welches sowohl mit Phosphat, als auch mit ester- und amidgebundenen Fettsäuren substituiert ist.

Die Position der interglykosidischen Bindung zwischen den beiden Glukosamineinheiten des Lipoid A-Rückgrats wurde mit der vollständigen Methylierungsanalyse nach Stellner et al. (22) ermittelt. Bei diesem Verfahren spaltet man nach Methylierung aller freien Hydroxylgruppen die Bindung zwischen den beiden Glukosamineinheiten durch Acetolyse. Die dabei freigeordneten Hydroxylgruppen werden dann acetyliert und die Position der Acetylgruppen anhand der Massenspektrometrie bestimmt. Aus der Position der Acetylgruppen kann man die Position der interglykosidischen Bindung rekonstruieren. Die anomere Konfiguration des nicht reduzierenden Glukosamins mußte in einem zusätzlichen Test mit β -N-Acetyl-Glukosaminidase ermittelt werden (Abb. 20).

Ein großer Nachteil an der klassischen Methylierungsanalyse besteht darin, daß bei der Acetolyse nicht nur die interglykosidische Bindung gespalten wird, sondern auch O-Demethylierungen erfolgen (am C-Atom 1 und 3, siehe Diskussion 4.1.6. und Caroff et al., 12). Da auch die dabei frei werdenden Hydroxylgruppen anschließend acetyliert werden, tauchen bei der gaschromatographischen Analyse der methylierten Alditolacetate einige Artefakte auf, die eine Auswertung der Chromatogramme erheblich erschweren (Abb. 10).

Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, können diese Schwierigkeiten umgangen werden, indem man intakte Glukosamin-Disaccharide nach Permethylierung direkt einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen-Analyse unterwirft. Da die unterschiedlich verknüpften Disaccharide in ihren Massenspektren für jede Bindung charakteristische Fragmente zeigen, ist eine saure Hydrolyse mit anschließender Derivatisierung nicht mehr nötig, sodaß auch keine Artefakte mehr entstehen können.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß bei der Gaschromatographie die β -Form der verschiedenen Disaccharide jeweils weit vor der entsprechenden α -Form eluiert. So kann in einem Analysengang die Position der Bindung und die anomere Konfiguration des nicht reduzierenden Glukosamins bestimmt werden. Damit benötigt man für die Analyse des Lipoid A-Rückgrats weniger Zeit und wesentlich geringere Mengen an Untersuchungsmaterial. Dies spielt z.B. eine wichtige Rolle bei Analysen von LPS aus *Rickettsia* und *Coxiella*, welche aufgrund der Kulturbedingungen (Ei-dotter) nur in Milligramm-Mengen isoliert werden können.

Diese neue Methode erleichtert aber nicht nur die weiteren Untersuchungen am Lipoid A-Rückgrat selbst, sondern bietet auch bessere Möglichkeiten zur eindeutigen Bestimmung der Position von Substituenten am Glukosamin-Disaccharid. So ist die Bindungsstelle des dOciA am Lipoid A bisher noch nicht durch eine Methylierungsanalyse bestimmt worden. Gmeiner (32) schloß

aufgrund von Ergebnissen nach Perjodatoxidation auf eine Bindung von dOclA in Position 3'. Einen anderen möglichen Weg bieten die Untersuchungen von Sidorczyk et al. (138) am Beispiel des LPS der Re-Mutante (R 45) aus Proteus mirabilis. Hier ist es durch selektive Hydrolyseschritte gelungen, das Lipoid A-Rückgrat (Glukosamin-Disaccharid) mit gebundenem dOclA-Trisaccharid frei von anderen Substituenten (Phosphat, Fettsäuren, 4-Aminoarabinose) zu isolieren. Dieses Material (Pentasaccharid) könnte einer Methylierungsanalyse nach Stellner unterworfen werden, wobei die dOclA-Position durch eine neu eingeführte Acetylgruppe (am nicht reduzierenden Glukosamin) erkennbar wäre. Aber auch hier ist abzusehen, daß die Interpretation der Chromatogramme durch O-Demethylierungen (bedingt durch Acetolyse) schwierig sein wird. Man könnte diese Schwierigkeiten aber dadurch vermeiden, indem man das Pentasaccharid zunächst permethyliert, anschließend die ketosidische Bindung von dOclA zu Glukosamin durch milde Säurehydrolyse spaltet, das verbleibende Glukosamin-Disaccharid mit Deuteromethyljodid remethyliert und dieses Produkt einer GLC-MS-Analyse unterwirft. Es ist vorstellbar, daß auf diese Weise die direkte GLC-MS-Analyse von Glukosamin-Disacchariden auch für die Bestimmung der Bindungsstelle von dOclA am Lipoid A angewendet werden kann.

Diese Art des Vorgehens müßte auch eine Bestimmung der Position der estergebundenen Phosphatgruppe möglich machen. Da aber eine Abspaltung des Phosphatrestes unter so milden Bedingungen nicht so leicht möglich ist wie im Falle von dOclA, ist die Erkenntnis, daß auch methylierte Zuckerphosphate einer GLC-MS-Analyse zugänglich sind von großer Bedeutung. Leider ist hier die Fragmentierung bei der Massenspektroskopie nicht so eindeutig, da kleinere Bruchstücke, welche die Phosphatgruppe enthalten, meist ungeladen sind. Anhand von Standard-Präparaten müssen hier noch mehr Erfahrungen über die Fragmentierungen von Glukosamin-3-, -4- und -6-Phosphat gesammelt werden.

Weitere wichtige Daten über die Position des estergebundenen Phosphates kann man eventuell aus der P^{31} - oder C^{13} -NMR-Spektroskopie erhalten. Hier haben Mühlradt et al. (83) und Rosner et al. (112) schon erste Untersuchungen durchgeführt. Die Position der Phosphatreste konnte allerdings auch aus den NMR-Daten nicht eindeutig herausgelesen werden. Rosner et al. führten zusätzlich noch chemische Untersuchungen durch. Diese Autoren oxidierten alle freien Hydroxylgruppen an de-O-acyliertem Lipoid A (*E.coli* K12) und spalteten anschließend den Phosphatrest mit Alkali (über eine β -Eliminierung) ab. Aber auch auf diesem Weg erhält man keine eindeutige Aussage über die Bindungsstelle des estergebundenen Phosphatrestes am Lipoid A-Rückgrat. Um diese zu ermitteln ist somit bisher immer noch die Kombination mehrerer Untersuchungsergebnisse aus verschiedenen Methoden nötig. Vielleicht können direkte GLC-MS-Analysen von Zuckerphosphaten in naher Zukunft hier eine klare Aussage ermöglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit neu beschriebenen Methoden der direkten GLC-MS-Analyse von Glukosamin-Disacchariden und Glukosamin-Phosphaten wurden bei der Strukturanalyse des Lipoid A dreier Yersinia enterocolitica Stämme (490 M, 75 R, 161-45a) entwickelt. Auch das Lipoid A dieser Stämme besitzt ein β -1,6 gebundenes Glukosamin-Disaccharid als Grundgerüst, welches mit zwei Mol Phosphat substituiert ist (Abb. 32). Zwischen den Lipoid A-Molekülen verschiedener Bakterien treten Unterschiede bei den Phosphat-substituenten dieses Grundgerüsts auf (Tab. 1). Obwohl innerhalb einer Bakterienfamilie immer der gleiche Substituent vorkommt, ist die Substitution dieser Phosphatreste auch hier nicht ganz einheitlich. So konnte am Beispiel von *Salmonella* gezeigt werden (66), daß die Anwesenheit dieser Substituenten auch durch die Kulturbedingungen der Bakterien beeinflußt wird. Selten liegen einheitliche Strukturen vor, sondern meistens Mischformen der Grundstruktur mit und ohne Substituenten. Diese Mikrohetero-

genität bezieht sich zunächst auf die Substituenten der Phosphatreste. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß auch die estergebundenen Fettsäuren ungleichmäßig über das Lipoid A-Grundgerüst verteilt sind.

Ähnlich wie im Lipoid A von Salmonella minnesota R 595 ist der estergebundene Phosphatrest bei Yersinia enterocolitica (490 M, 75 R) zu etwa 30% mit 4-Aminoarabinose besetzt. An diesem Substituenten wird die Mikroheterogenität des Lipoid A-Moleküls deutlich. Nur jedes dritte Molekül kann mit 4-Aminoarabinose substituiert sein, während zwei Moleküle einen freien estergebundenen Phosphatrest besitzen. Im Stamm Yersinia enterocolitica 161-45a kommt keine 4-Aminoarabinose vor.

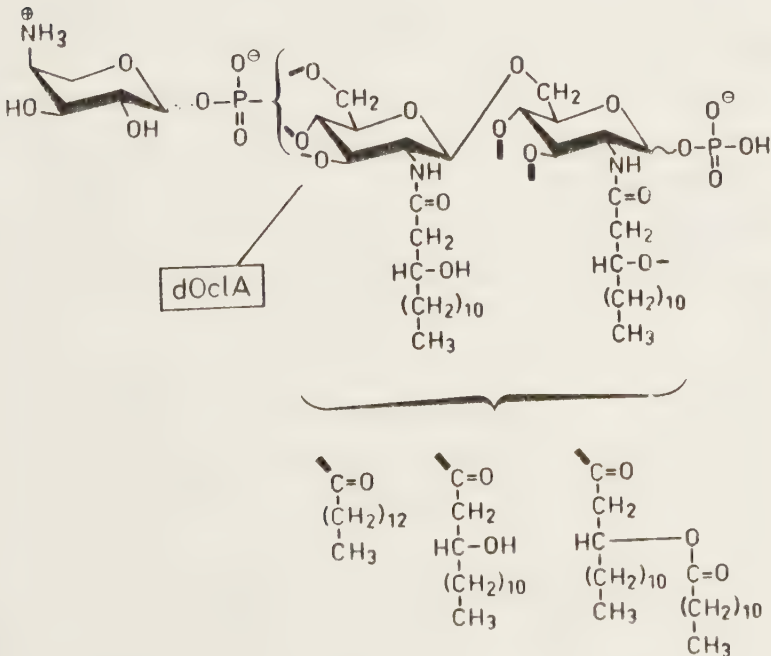


Abb. 32: Chemische Struktur des Lipoid A von Yersinia enterocolitica

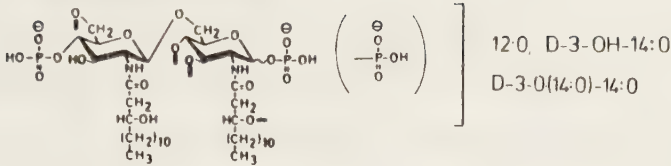
Für den glykosidisch gebundenen Phosphatrest konnte dagegen bei allen drei Stämmen kein Substituent gefunden werden. Damit nimmt das Lipoid A von Yersinia enterocolitica eine Stellung zwischen dem von Salmonella, welches an beiden Phosphatresten substituiert ist, und dem von E.coli ein, dessen Phosphatgruppen unsubstituiert sind (Abb. 33). Rosner und Khorana (112) haben allerdings bei E.coli festgestellt, daß unter bestimmten Wachstumsbedingungen ein Lipoid A synthetisiert wird, welches eine Pyrophosphatgruppe statt eines Phosphatrestes in glykosidischer Bindung trägt (Tab. 1 und Abb. 33).

In der Fettsäurezusammensetzung weicht das Lipoid A von Yersinia enterocolitica von dem anderer Enterobacteriaceen ab. In allen drei Stämmen liegt etwa 1 Mol D-3-Hydroxymyristinsäure pro Mol Glukosamin-Disaccharid in Esterbindung vor. In den beiden Stämmen 490 M und 75 R ist etwa die Hälfte dieser estergebundenen 3-Hydroxymyristinsäure an der Hydroxylgruppe mit Laurinsäure verestert. Dieser Lauroxymyristinsäureester ist bisher ausschließlich in Yersinia enterocolitica gefunden worden. Bei den anderen bisher untersuchten Enterobacteriaceen kommt immer ein 3-Myristoxymyristinsäureester vor (Tab. 3).

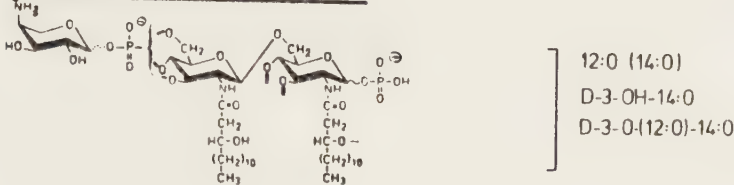
Darüberhinaus liegen im Stamm 490 M 0.5 Mol Laurinsäure, und bei den Stämmen 75 R und 161-45a 0.5 Mol Myristinsäure in Esterbindung vor. Palmitinsäure wurde in allen drei Stämmen nur in geringen Mengen gefunden. Die Aminogruppen des Glukosamin-Disaccharides sind quantitativ mit D-3-Hydroxymyristinsäure verestert, wobei diese eventuell an ihrer Hydroxylgruppe noch einen Substituenten trägt.

Besonders auffallend ist bei Yersinia enterocolitica die Tatsache, daß nur etwa 2 Mol Fettsäuren am Lipoid A-Rückgrat estergebunden vorliegen (Tab. 18).

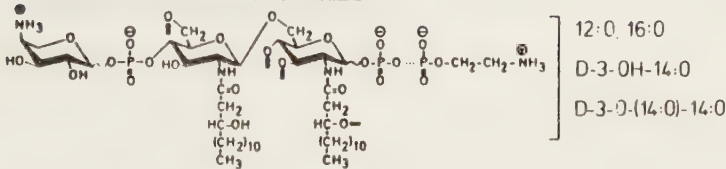
Escherichia coli



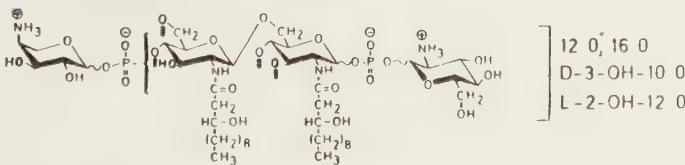
Yersinia enterocolitica



Salmonella minnesota



Chromobacterium violaceum



Rhodospirillum tenue

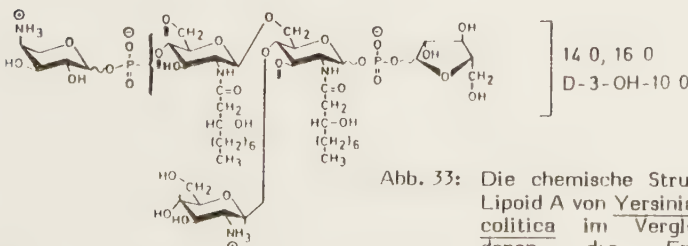


Abb. 33: Die chemische Struktur des Lipid A von Yersinia enterocolitica im Vergleich zu denen der Enterobacteriaceen E.coli und Salmonella minnesota einerseits und zu denen anderer gram negativer Bakterien wie Chromobacterium violaceum und Rhodospirillum tenue.

Das könnte bedeuten, daß entweder Hydroxylgruppen des Disaccharides frei vorliegen oder einen bisher nicht identifizierten Substituenten tragen. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, daß sich die oben erwähnte Mikroheterogenität auch auf die Verteilung der Fettsäuren erstreckt. So ist bis heute nicht bekannt, ob Transferasen existieren, die gleichermaßen spezifisch für eine Fettsäure und die Akzeptor-Hydroxylgruppe sind oder ob die ester gebundenen Fettsäuren statistisch über die Hydroxylgruppen des Glukosamin-Disaccharides verteilt sind.

Ähnliche Fettsäurezusammensetzungen, wie sie für Yersinia enterocolitica ermittelt wurden, haben Krasikova et al. (60) in Yersinia pseudotuberculosis (Laurin- und 3-Hydroxymyristinsäure als Hauptbestandteile und wenig Myristin und Palmitinsäure) gefunden. Erler et al. (16) identifizierten in dem früher mit Yersinia in einer Gattung zusammengefaßten Stamm Pasteurella multocida 2 Mol Myristinsäure und 4 Mol D-3-Hydroxymyristinsäure. In diesem Fall liegt allerdings ein Myristoxymyristinsäureester vor, worin sich Pasteurella von Yersinia unterscheidet (Tab. 3).

Die strukturellen Ähnlichkeiten des Lipoid A von Yersinia enterocolitica mit dem von Salmonella wurden durch Untersuchungen der serologischen Kreuzreaktion (in vitro) bestätigt. Sowohl beim Absorptionstest, als auch beim Test der passiven Hämolyse und Hämolysehemmung konnte eine vollständige Kreuzreaktion zwischen Salmonella und Yersinia Lipoid A festgestellt werden. Nach neueren Untersuchungen (47) enthält Salmonella Lipoid A als immunologisch reaktive Determinante eine D-3-Hydroxyacyl-D-Glukosamin-Gruppe. Dieses Strukturelement kommt auch in Yersinia enterocolitica Lipoid A vor, und es ist anzunehmen, daß es für die biologische Kreuzreaktion verantwortlich ist. Auch in vivo konnte eine lipidspezifische Kreuzreaktion

zwischen Salmonella und Yersinia LPS festgestellt werden. Anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum unterdrückte weitgehend eine durch Yersinia LPS ausgelöste Fieber-Reaktion in Kaninchen.

Diese biologischen Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse der chemischen Analyse des Lipoid A von Yersinia enterocolitica, nämlich, daß Yersinia Lipoid A in seiner Struktur sehr eng verwandt mit denen der anderen Enterobacteriaceen wie Salmonella, E.coli, Shigella und Proteus ist.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Züchtung der Bakterien und Gewinnung des LPS

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bakterien waren drei verschiedene Mutanten der Spezies Yersinia enterocolitica (490 M, 75 R und 161-45a). Die Mutante 490 M wurde von Herrn Dr. Rohde (Institut für Mikrobiologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die beiden anderen Mutanten erhielten wir von Herrn Prof. Knapp und Dr. Wartenberg (Institut für klinische Mikrobiologie und Infektionshygiene, Universität Erlangen-Nürnberg).

Die Bakterien wurden nach dem Batch-Verfahren in Ansätzen von 14 Litern unter aeroben Bedingungen bei pH 7.2 und 30°C gezüchtet (117). Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde nach 9-10 Stunden durch Zugabe von Phenol (Endkonzentration 1%) gestoppt.

Die Lipopolysaccharide dieser Mutanten wurden nach der Phenol/Chloroform/Petroläther-Methode isoliert und durch Ultrazentrifugation gereinigt (20).

6.2. Chemische Methoden

6.2.1. Präparative Methoden

6.2.1.1. Reduktion mit Natriumborhydrid

6.2.1.1.1. Milde Reduktion

Die Probe (2 mg) wurde in Wasser (0.2 ml) gelöst, mit 10%-iger Natriumborhydridlösung (0.1 ml) versetzt und für 12-15 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Anschließend wurde so viel 1N Essigsäure zugegeben, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu erkennen war. Die freie Borsäure wurde durch mehrfaches Evaporieren mit essigsaurem Methanol entfernt.

6.2.1.1.2. Starke Reduktion

Zur Reduktion von Aminosukcern, deren Aminogruppe mit einer Fettsäure substituiert ist (z.B. im Lipoid A-OH) wurde die oben beschriebene Reduktion bei erhöhter Temperatur (57°C, 12 h) durchgeführt.

6.2.1.2. Hydrazinolyse

Etwa 50 mg (5 mg) Substanz, bei 70°C für 4 Stunden im Vakuum getrocknet, wurden in 10 ml (1 ml) Hydrazin (wasserfrei, Roth/Karlsruhe) unter Erhitzen und Ultraschallbehandlung suspendiert. Zur quantitativen Abspaltung der ester- und amidgebundenen Fettsäuren wurde die Probe für 19 Stunden, oder, falls auch das estergebundene Phosphat quantitativ durch Hydrazinolyse entfernt werden sollte, für 40 Stunden auf 103°C erhitzt. Unter Kühlen im Eisbad wurde das überschüssige Hydrazin durch Zugabe von Aceton in das Hydrazon überführt (welches man im Vakuum leichter entfernen kann) und anschließend die Probe lyophilisiert. Durch mehrmaliges Waschen mit Aceton wurden die Fettsäurehydrazide abgetrennt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und die wasserunlöslichen Substanzen abzentrifugiert. Die in der Wasserphase löslichen fettsäurefreien Zucker wurden mit der Hochspannungspapiererelektrophorese aufgetrennt (siehe 6.2.4.3.).

6.2.1.3. Acetylierung von Zuckern

6.2.1.3.1. N-Acetylierung der Aminosucker

Die in Wasser gelösten Proben (4 mg/ml) wurden mit 10%-iger NaOH (0.1 ml) alkalisiert und mit Acetanhydrid (0.01 ml) versetzt. Nach 3 Minuten bei Raumtemperatur wurden erneut 10%-ige NaOH (0.1 ml) und Acetanhydrid (0.01 ml) zugegeben. Insgesamt wurde so dreimal auf diese Weise acetyliert. Anschließend wurde mit Acetanhydrid der pH auf etwa 6-7 gebracht und die Probe am Rotationsverdampfer mehrfach mit Wasser zur Trockne evaporiert.

6.2.1.3.2. Peracetylierung von Zuckern

Die trockene Probe (etwa 2 mg) wurde mit Acetanhydrid (0.3 ml) und Pyridin (0.3 ml) 30 Minuten lang auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde mehrmals nach Zugabe von Wasser am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

6.2.1.4. Herstellung von Alditolacetaten für die gaschromatographische Untersuchung (nach Sawardecker)

LPS (3 mg) wurde in 0.1 N HCl (1 ml) suspendiert und 48 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Zur Neutralisation wurde mit Wasser auf etwa 6 ml verdünnt und IR-410 Ionenaustauscher dazugegeben. Nach etwa 10 Minuten, als die Lösung neutral war, wurde über eine Sinternutsche in einen Spitzkolben abfiltriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne evaporiert. Anschließend wurden die Zucker mit Natriumborhydrid reduziert (siehe 6.2.1.1.1.) und mit 1 ml Pyridin/Acetanhydrid 1:1 acetyliert (siehe 6.2.1.3.2.). Die acetylierten Zucker wurden in Chloroform gelöst, von eventuell vorhandenem Natriumacetat abfiltriert und gaschromatographisch untersucht.

6.2.1.5. Derivatisierung von 4-Amino-Arabinose zur semiquantitativen gaschromatographischen Bestimmung

LPS (5 mg) wurde mit Natronlauge und Acetanhydrid (siehe 6.2.1.3.1.) N-acetyliert. Zur Abspaltung der 4-Aminoarabinose wurde das N-acetylierte LPS unter Erhitzen und Ultraschallbehandlung in Wasser (0.6 ml) gelöst und nach Zugabe von 1 N HCl (0.012 ml → 0.02 N HCl) für 10 Minuten bei 100°C hydrolysiert. Die unlöslichen Anteile wurden abzentrifugiert und zweimal mit 0.02 N HCl (je 0.5 ml) gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden mit Wasser auf ein Volumen von etwa 10 ml verdünnt, neutralisiert, reduziert und acetyliert, wie bei der Herstellung der Alditolacetate beschrieben.

6.2.1.6. Isolierung des Lipoid A-Rückgrats (41)

6.2.1.6.1. Darstellung von LPS-OH

LPS (100 mg) wurde in Wasser (11.4 ml) mit Ultraschallbehandlung und Erhitzen gelöst. Nach Zugabe von 4 N NaOH (0.6 ml $\rightarrow$ 0.2 N NaOH, wobei eine leichte Trübung entstehen kann) wurde die Probe 1 h auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde gegen Wasser dialysiert, bis das Dialysat keine alkalische Reaktion mehr zeigte (etwa 24 Stunden). Das Retentat (LPS-OH) wurde lyophilisiert, und die vereinigten Dialysate wurden nach Neutralisation mit HCl am Rotationsverdampfer getrocknet (Ausbeute siehe Tabelle 8, Seite 28).

6.2.1.6.2. Darstellung von Lipoid A-OH

LPS-OH (60 mg) wurde mit Ultraschall und durch Erhitzen in Wasser (9.9 ml) gelöst. Nach Ansäuern mit 4 N HCl (0.1 ml $\rightarrow$ 0.04 N HCl) wurde bei 100°C 30 Minuten hydrolysiert. (In den Fällen, bei denen nach 20 Minuten noch kein Präzipitat erschien, wurde nochmals 4 N HCl (0.1 ml) hinzugefügt und für weitere 30 Minuten erhitzt). Nach gutem Kühlen in Eiswasser wurde das Präzipitat abzentrifugiert, dreimal mit 0.04 N HCl gewaschen und lyophilisiert.

6.2.1.6.3. Darstellung des freien reduzierten Lipoid A-Rückgrats (Glukosamin- Disaccharid)

Lipoid A-OH (30 mg) wurde mit Natriumborhydrid reduziert (siehe 6.2.1.1.2., 57°C) und einer 40-stündigen Hydrazinolyse unterworfen (6.2.1.2.). Das Hydrazinolysat wurde mit der Hochspannungspapierelektrophorese aufgetrennt. Das gewünschte Glukosamin-Disaccharid hatte eine Wanderungsgeschwindigkeit von $M_{\text{GlcN}} = 1.12$.

6.2.1.7. Methylierung von Zuckern nach Hakomori (38)

Die Zucker können für die Methylierung in reduzierter oder nicht reduzierter Form vorliegen. Aminozucker sollten N-acetyliert sein. Alle Reaktionen unter Stickstoff wurden in Serumgläsern durchgeführt, die gut mit einer Teflon-beschichteten Bördelkappe (Klingenfuß, Freiburg) verschlossen waren. Die Zugabe von Reagenzien erfolgte über Kanülen.

6.2.1.7.1. Darstellung des Dimethylsulfinylcarbanions

Zunächst wurde 50%-iges Natriumhydrid in Öl (100-120 mg, Roth/Karlsruhe) dreimal mit Petroläther (kp 50-60°) gewaschen. Das auf diese Weise gereinigte Natriumhydrid (50 mg) ließen wir mit einem Überschuß an Dimethylsulfoxyd (etwa 1.5 ml DMSO, wasserfrei, Merck) unter Stickstoff bei 50°C (Wasserbad) reagieren, bis die Lösung eine tiefgrüne Farbe zeigte, und sich kein Wasserstoff mehr entwickelte (nach etwa 60-90 Minuten). Bei höheren Temperaturen können sich leicht braune oder andersfarbige Lösungen entwickeln, die nicht für Methylierungen geeignet sind.

6.2.1.7.2. Methylierungsreaktion

In einem Serumgläsern wurde die Zuckerprobe (etwa 2 mg) mit Ultraschallbehandlung und unter Rühren in DMSO (0.3 ml) gelöst. Für 30 Sekunden wurde die Probe mit Stickstoff über zwei Kanülen begast, anschließend 0.4 ml des tiefgrünen Natriumdimethylsulfinylcarbanions addiert und die Mischung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde tropfenweise Methyljodid (total 0.8 ml) unter Kühlen (exotherme Reaktion) dazugegeben. Nach weiteren 4-5 Stunden wurde die Probe über eine Sephadex LH-20 Säule gegeben. Dabei wurden einzelne Fraktionen von etwa 1 ml gesammelt, bis eine gelbbraune Phase (Jod) erschien. Einige µl jeder Fraktion wurden auf

eine DC-Alufolie (Kieselgel 60, Merck) aufgedippt, mit 5%iger Schwefelsäure in Methanol besprüht und 5-10 Minuten auf 100°C erhitzt. Braunfärbung zeigt die Anwesenheit von Zuckern an. Die zuckerhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und gaschromatographisch untersucht.

6.2.1.8. Methylierungsanalyse von Glukosamin-Disacchariden nach Stellner et al. (122).

Die reduzierten und N-acetylierten Glukosamin-Disaccharide wurden nach Hakomori methyliert und nach Reinigung über Sephadex LH-20 (siehe 6.2.1.7.2.) gereinigt. Mit 0.3 ml Säuremischung (95 ml Eisessig + 5 ml 10 N Schwefelsäure) wurde dann zunächst für 16 Stunden und nach Zugabe von 0.3 ml Wasser für weitere 5 Stunden bei 80°C hydrolysiert. Das saure Reaktionsgemisch wurde über eine kleine IR-45 Ionenaustauschersäule (5 cm) neutralisiert. Anschließend wurde zunächst eine milde Reduktion bei Raumtemperatur (siehe 6.2.1.1.1.) und dann eine Peracetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin (6.2.1.3.2.) durchgeführt. Die partiell methylierten Alditolacetate wurden gaschromatographisch (ECNSS-M, 170°C) und massenspektrometrisch untersucht.

6.2.1.9. Enzymatische Phosphatabspaltung mit Phosphomonoesterase

Die phosphathaltige Probe (0.5 mg) wurde in Wasser (0.05 ml) gelöst, mit 0.2 M Bikarbonatpuffer (0.05 ml, pH 8.4) und alkalischer Phosphomonoesterase (2 µl, aus E.coli Typ III, Sigma) 120 Minuten bei 57°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Essigsäure auf pH 6 gebracht, im Exsiccator getrocknet und mit Hilfe des Aminosäureanalysators oder der Hochspannungspapier-elektrophorese untersucht.

6.2.2. Kolorimetrische Bestimmungsmethoden

Für die quantitativen Bestimmungen wurden neben der Gaschromatographie und dem Aminosäureanalysator die folgenden chemisch kolorimetrischen Methoden verwendet.

6.2.2.1. Phosphat

Phosphat wurde nach der Methode von Lowry et al. (69) mit Ammoniummolybdat bestimmt.

Reagenzien:

A) Aufschlußreagenz:

62,7 ml H_2O + 30,6 ml H_2SO_4 konz. + 6,7 ml 70% HClO_4

B) Ammoniummolybdatreagenz für Gesamtphosphat:

1 ml 1 M Na-Acetat

+ 1 ml 2,5%ige Ammoniummolybdatlösung

+ 7 ml Wasser

mischen und gut kühlen (0-4°C). Zum Schluß 1 ml gut gekühlte (0-4°C) 10%ige Ascorbinsäurelösung zugeben.

C) Ammoniummolybdatlösung für anorganisches Phosphat:

4,7 ml Wasser

+ 0,7 ml 10 N Schwefelsäure mischen und kühlen (0-4°C).

+ 0,6 ml 2,5%ige Ammoniummolybdatlösung

+ 3,0 ml 10%ige Ascorbinsäurelösung nach Kühlen zugeben.

Die Temperatur der Reagenzien soll beim Mischen nicht über 4-5°C liegen.

6.2.2.1.1. Gesamtphosphat

Zur Bestimmung des Gesamtphosphates wurden die trockenen Proben mit Aufschlußreagenz (0.1 ml) für 1 Stunde bei 100°C und für 2 weitere Stunden

bei 165°C hydrolysiert. Nach Zugabe von 1 ml Reagenz B wurde für 90 Minuten bei 38°C inkubiert und anschließend im Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 820 nm gemessen.

6.2.2.1.2. Anorganisches Phosphat

Anorganisches Phosphat wurde bestimmt, indem die Probe in Wasser (0.1 ml) gelöst und nach Zugabe von 0.9 ml Reagenz C für 30 Minuten bei 38°C inkubiert wurde. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 820 nm gemessen.

6.2.2.2. Glukosamin (Morgan-Elson-Reaktion)

Glukosamin wurde nach der Methode von Morgan-Elson (79) in der Abwandlung nach Strominger (123) bestimmt.

Reagenz: Morgan-Elson-Reagenz.

Zu einer Lösung von 16 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 95 ml Eisessig wurden 5 ml HCl konz. zugegeben. Das Reagenz sollte vor Gebrauch mindestens drei Tage alt sein. Direkt vor der Verwendung wurden 2 ml Morgan-Elson-Reagenz mit 5 ml Eisessig verdünnt.

6.2.2.2.1. Die direkte Morgan-Elson-Reaktion (ohne Hydrolyse)

Die in Wasser (0.05 ml) gelösten Proben wurden mit 2%-iger Bikarbonatlösung (0.05 ml) alkalisiert.

Nach Zugabe von 5%-iger Acetanhydridlösung in Wasser (0.01 ml) wurden sie für 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend für 3 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen (4°C) wurden 0.7 ml Morgan-Elson-Reagenz addiert und die Probe für 20 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Extinktion wurde bei 585 nm gemessen.

6.2.2.2. Effekte, welche die Chromogenbildung bei der Morgan-Elson-Reaktion beeinflussen

Für die Interpretation der Extinktionswerte ist es nötig zu wissen, daß die Farbintensität des Chromogens von Substituenten am Glukosamin stark beeinflußt wird. Beim Erhitzen mit Alkali bilden 2-Acetamido-2-desoxy-hexosen unter Abspaltung von Wasser verschiedene Chromogene, welche mit Ehrlichs Reagenz gleiche Farbreaktionen liefern (62). Hexosamine mit Substituenten in Position 4 rufen keine Farbreaktion hervor, da für die Chromogenbildung die Bildung eines furanoiden Ringes als Zwischenprodukt nötig ist. Auch ein glykosidisch gebundener Substituent in Position 1 verhindert die Farbentstehung. Setzt man zum Vergleich die Farbintensität von freiem Glukosamin als 100%, so beträgt diese nur etwa 75%, wenn die Aminogruppe mit einer 3-Hydroxymyristinsäure besetzt ist. Ein Substituent in Position 3 verstärkt die Farbintensität bis zu 200%, während ein Substituent am C-Atom 6 gegenüber freiem Glukosamin keine Änderung der Farbausbeute bewirkt. Wichtig ist auch zu wissen, daß Glukosaminitol kein Chromogen bilden kann (30).

		Farbausbeute
Freies Glukosamin		100%
Mit Substituent an	C-6	100%
Mit Substituent an	C-3	150-200%
Mit Substituent an (3-Hydroxymyristinsäure)	NH ₂ (C-2)	75%
Mit Substituent an	C-4	0%
Freies Glukosaminitol		0%

Da die Substituenten bei der direkten Morgan-Elson-Reaktion eine so große Rolle spielen können, und das Glukosamin im Lipoid A als Disaccharid vorliegt, muß man zur Gesamtglukosaminbestimmung die Probe hydrolysieren.

Durch einen Vergleich der Ergebnisse aus der Gesamtglukosaminbestimmung und der direkten Morgan-Elson-Reaktion kann man Rückschlüsse auf Substituenten und Verknüpfung von Glukosamineinheiten ziehen.

Für ein Glukosamin-Disaccharid ist folgendes zu erwarten: Bei der Gesamtglukosaminbestimmung werden beide Zuckereinheiten erfaßt (entsprechend 100%). Die direkte Morgan-Elson-Reaktion gibt nach obigen Regeln im Falle einer 1-4 Bindung keine Farbausbeute, bei einer 1-6 Bindung 50% Farbausbeute. Wenn das reduzierende Glukosamin mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert ist, entsteht auch bei einem 1-6 gebundenen Glukosamin-Disaccharid kein Chromogen mehr. Nach Hydrolyse wäre die Farbausbeute in diesem Fall nur 50%.

6.2.2.2.3. Gesamtglukosamin (Morgan-Elson-Reaktion nach Hydrolyse)

Etwa 0.5 mg der zu untersuchenden Substanz wurden in 0.5 ml 4 N HCl 10 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Die entsprechende Menge dieses Hydrolysates (etwa 0.01-0.02 mg Glukosamin) wurde in Reagenzgläschen pipettiert und gut im Vakuum über KOH getrocknet. Zur Bestimmung darf auf keinen Fall noch Salzsäure vorhanden sein. Nach dem Lösen der Probe in Wasser (0.05 ml) wurde wie bei der direkten Morgan-Elson-Reaktion verfahren.

6.2.2.3. dOclA (3-deoxy-D-manno-octulonsäure = KDO)

Die Bestimmung von dOclA wurde nach der modifizierten Methode von Weissbach und Hurwitsch (130) mittels Perjodatoxidation durchgeführt. Das dabei gebildete β -Formylpyruvat bildet mit Thiobarbitursäure ein Chromogen. Zum Vergleich wurde eine neue Variation nach Karkhanis et al. (50) erprobt, bei welcher etwas veränderte Mengen an Reagenzien verwendet wurden. Außerdem wird bei der neuen Methode das Chromogen zum Schluß nicht mehr mit Butanol/HCl extrahiert, sondern man gibt nur DMSO (in dem alle Komponenten löslich sind) zur gesamten Reaktionsmischung dazu.

Die neue Methode hat folgende Vorteile:

- a) Unlösliches Material wird nach der Hydrolyse mit Schwefelsäure abzentrifugiert.
- b) Die Zugabe von DMSO verhindert Trübungen bei Raumtemperatur.
- c) Die Farbintensität des Chromogens wird durch Zugabe von DMSO erhöht, sodaß geringere Mengen dOclA nachgewiesen werden können.
- d) Neuraminsäure gibt unter den angegebenen Bedingungen nur eine sehr schwache Farbreaktion.
- e) Außerdem ist das Chromogen in DMSO bei Raumtemperatur tagelang stabil.

6.2.2.3.1. und 6.2.2.3.2. Die beiden Methoden der dOclA-Bestimmung
im Vergleich

Methode nach Weissbach (130)

1). Probe in 0.05 ml H_2O lösen
+ 0.05 ml 0.5 N H_2SO_4
8 Min., 100°C

2). + 0.05 ml 0.1 M HJO_4
10 Min., 55°C

3). + 0.2 ml 4%ige Natrium-
arsenitlösung in 0.5 N
HCl bei Zimmertemperatur
stehen lassen, bis die
Lösung farblos ist.

4). + 0.8 ml 0.6%ige frische
Thiobarbitursäurelösung
10 Min., 100°C

5). Nach dem Abkühlen das
entstandene Chromogen mit
1 ml Butanol/HCl konz.
(95:5) extrahieren.

6). Die Extinktion wird bei
den Wellenlängen 552 nm
und 508 nm gemessen.
Zur Berechnung wird der
zweite Wert vom ersten abgezogen.

Methode nach Karkhanis (50)

1). Probe in 0.5 ml H_2O lösen
+ 0.5 ml 0.4 N H_2SO_4
30 Min., 100°C

1b). Die Proben 5 Min. zentri-
fugieren und 0.5 ml vom
Überstand abpipettieren.

2). Zum Überstand 0.25 ml
0.04 M HJO_4 in 0.125 N
 H_2SO_4 geben
20 Min., 20°C

3.) + 0.25 ml 2.6%ige Natrium-
arsenitlösung in 0.5 N
HCl bei Zimmertemperatur
stehen lassen, bis die
Lösung farblos ist.

+ 0.5 ml 0.6%ige frische
Thiobarbitursäurelösung
15 Min., 100°C

5). Zur noch heißen Lösung
1 ml DMSO geben.

6.) Die Extinktion wird bei
der Wellenlänge von 548 nm
gemessen.

6.2.3. Qualitative und quantitative Fettsäureanalysen (nach Rietschel, 107)

Die Fettsäuren wurden qualitativ und quantitativ gaschromatographisch als Methylester untersucht.

6.2.3.1. Reagenzien

6.2.3.1.1. 0.5 N Natriummethylatlösung

Für die Umesterung estergebundener Fettsäuren (Methanolyse) ist es unbedingt notwendig, absolut wasserfrei zu arbeiten, da die Fettsäuremethylesterbildung durch Spuren von Hydroxyl-Ionen gestört wird (Verseifung). Daher wurde wasserfreies Methanol (max. 0.01 % Wasser, Merck) verwendet. Außerdem waren alle Glasgeräte mit Aceton gespült und im Trockenschrank getrocknet.

Zur Herstellung des Natriummethylats wurde ein Stück Natrium mit einem Gewicht von etwa 1.5-3.0 g kurz mit Methanol abgespült und in einen tarierten Kolben mit Schliff gegeben, welcher 50 ml Methanol enthielt. Auf dem Kolben wurde ein offenes Trockenrohr (CaCl_2) angebracht und das genaue Gewicht des zugegebenen Natriums bestimmt. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit soviel Methanol verdünnt, daß die Konzentration des Natriummethylates 0.5 N betrug.

6.2.3.1.2. Ätherische Diazomethanlösung

Nitrosomethylharnstoff (etwa 1.0 g) wurde zu einer auf 0°-4°C vorgekühlten Mischung von 2 ml Äther mit 1 ml 40%-iger KOH gegeben. Unter leichtem Schütteln bildete sich während 5-10 Minuten eine gelbe ätherische Diazomethanlösung, die abpipettiert (Peleus-Ball) und bei 4°C über KOH-Rotuli getrocknet wurde.

6.2.3.2. Methoden

6.2.3.2.1. Zugabe des inneren Standards

Bei allen quantitativen Bestimmungen wurde vor der Freisetzung der Fettsäuren Heptadecansäure, gelöst in Chloroform, als innerer Standard zugegeben. Das Chloroform wurde unter Vakuum wieder abgezogen.

6.2.3.2.2. Ausschütteln der Fettsäuren mit Chloroform

Die wässrige oder methanolische fettsäurehaltige Phase (etwa 4-5 ml) wurde in einem Schütteltrichter zuerst mit Salzsäure bis zum pH von etwa 4 angesäuert und dann mit Wasser verdünnt (auf 15-20 ml). Anschließend wurde 3-4 mal sorgfältig mit Chloroform (10-15 ml) extrahiert und die vereinigten Chloroformphasen mit möglichst wenig Natriumsulfat (wasserfrei, Merck) von eventuell vorhandenem Wasser befreit. Nach dem Filtrieren wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

6.2.3.2.3. Herstellung der Fettsäuremethylester mit Diazomethan

Die freien Fettsäuren wurden in Äther (0.5 ml) gelöst. Nach Zugabe von einem Tropfen Methanol als Katalysator wurde solange ätherische Diazomethanlösung (siehe 6.2.3.1.2.) dazugegeben, bis die gelbe Farbe bestehen blieb. Nach etwa 10 Minuten wurde die Probe mit einem leichten Stickstoffstrom getrocknet, in Chloroform (Hexan) wieder gelöst und in den Gaschromatographen injiziert.

6.2.3.2.4. Herstellung von Methoxyfettsäuremethylester mit Diazomethan/Bortrifluorid-diäthylätherat

In Gegenwart von Bortrifluorid-Äthylätherat reagieren Hydroxyfettsäuren mit Diazomethan zu Methoxyfettsäuremethylestern. Diese Reaktion muß bei etwa 15°C mit gekühlten Lösungen durchgeführt werden. Zu der in Äther

(0.5 ml) gelösten Probe (0.5 mg) wurden 2 Tropfen Bortrifluorid-Diäthylätherat (als Katalysator) und vorgekühlte (-15°C) ätherische Diazomethanlösung 3-4 mal langsam zugegeben. Nach jeweils 5 Minuten wurde diese Reaktion so oft wiederholt, bis eine schwache Gelbfärbung für etwa 30 Sekunden erhalten blieb. Um eventuell entstandenes Polyäthylen zu entfernen, wurde die Reaktionsmischung filtriert. In einem Schütteltrichter wurde die Ätherphase einmal mit gesättigter Bikarbonatlösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Abschließend wurde die Ätherphase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

6.2.3.3. Analyse der Gesamtfettsäuren

LPS (2 mg) und 60 μl innerer Standard wurden mit 1 ml 4 N Salzsäure für zunächst 4 Stunden und nach Zugabe von 2 ml 8 N Kalilauge für eine weitere Stunde auf 100°C erhitzt. Nach Ansäuern (8 N HCl) wurden die freien Fettsäuren mit Chloroform extrahiert (siehe 6.2.3.2.2.). Die so erhaltenen freien Fettsäuren wurden dann mit Diazomethan (siehe 6.2.3.2.3.) in die Methylester überführt und gaschromatographisch bestimmt.

6.2.3.4. Analyse der estergebundenen Fettsäuren

Im Vakuumtrockenschrank getrocknetes LPS (10 mg) und 150 μl innerer Standard wurden in 0.5 N Natriummethylat (3 ml) suspendiert und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. (Die Methanolyse wurde auch bei 37°C durchgeführt, wobei die gleichen Ergebnisse erzielt wurden). Die Fettsäuremethylester der vormals estergebundenen Fettsäuren wurden mit Chloroform ausgeschüttelt (siehe 6.2.3.2.2.). Um feststellen zu können, wie quantitativ die Fettsäuren nach der alkalischen Methanolyse als Methylester vorliegen, wurde die Probe in zwei gleiche Teile geteilt, von denen der eine direkt analysiert und der andere vor der gaschromatographischen Untersuchung noch mit Diazomethan behandelt wurde (siehe 6.2.3.2.3.).

6.2.3.5. Analyse der amidgebundenen Fettsäuren

Das Sediment nach der Methanolyse (7 mg) wurde zweimal mit Aceton gewaschen. Nach Zugabe von 300 µl inneren Standards wurde ebenso verfahren wie zur Bestimmung der Gesamtfettsäuren (siehe 6.2.3.3.).

6.2.3.6. Bestimmung der absoluten Konfiguration der 3-Hydroxymyristinsäure

LPS (20-30 mg) wurde mit 4 N Kalilauge (2-3 ml) für 5 Stunden bei 100°C behandelt. Die mit Chloroform extrahierten freien Fettsäuren (siehe 6.2.3.2.2.) wurden mit Diazomethan/Bortrifluorid-Diäthylätherat (siehe 6.2.3.2.4.) behandelt. (Es empfiehlt sich, die Probe anschließend direkt gaschromatographisch zu untersuchen, um festzustellen, ob die 3-Hydroxyfettsäure auch tatsächlich quantitativ in die 3-Methoxyfettsäuremethylester umgesetzt worden sind).

Anschließend wurde die Probe mit 1 N Kalilauge (1 ml) für 2 Stunden bei 70°C verseift. Die dabei gebildeten freien Methoxysäuren wurden nun dünn-schichtchromatographisch von nicht methoxylierten Fettsäuren getrennt (siehe 6.2.4.2.).

Die mit Äther eluierten 3-Methoxyfettsäuren wurden in ein mit einer Bördelkappe verschlossenes Serumgläschen transferiert, und der Äther wurde (unter Verwendung von zwei Kanülen) mit einem leichten Stickstoffstrom evaporiert.

Um die Methoxyfettsäuren in das Säurechlorid zu überführen wurden destilliertes Chloroform (1 ml) und Thionylchlorid (0,25 ml) in das Serumgläschen gegeben und dieses für 30 Minuten auf 60°C erwärmt. Nach sorgfältigem Trocknen mit Stickstoff wurde erneut in Chloroform (1 ml) gelöst und L-Phenyläthylamin dazugegeben. Nach etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Serumgläschen geöffnet, die Reaktionsmischung in

einen Scheidetrichter überführt und die Chloroformphase einmal mit schwach salzsauerm Wasser und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde mit Natriumsulfat (wasserfrei, Merck) getrocknet, filtriert und eingengt. Die vorliegenden diastereomeren Phenyläthylamide der Methoxyfettsäuren wurden gaschromatographisch untersucht (OV-1).

6.2.3.7. Isolierung und Identifizierung des Substituenten an der estergebundenen 3-Hydroxyfettsäure

LPS (100 mg) wurde in Wasser (15 ml) gelöst und gekühlt (4°C). Nach Zugabe von 4 N NaOH (1 ml $\longrightarrow$ 0.25 N NaOH) wurde für 5 Minuten auf 37°C erwärmt, anschließend sofort wieder gut im Eisbad abgekühlt und auf pH 4-5 angesäuert. Die freigesetzte 3-Acyloxy-myristinsäure wurde mit Chloroform extrahiert (siehe 6.2.3.2.2.) und nach Trocknen, Filtrieren und dem Evaporieren mit Diazomethan (siehe 6.2.3.2.3.) verestert.

Mit Hilfe der kombinierten GLC-MS-Analyse (SE-30, 10%, 260°C) wurde die veresterte 3-Acyloxy-myristinsäure anhand der Retentionszeit im Vergleich mit einem authentischen Standard (3-Myristoxy-myristinsäuremethylester) identifiziert.

6.2.3.8. Gesamtacetylbestimmung (19)

LPS (3 mg) wurde mit 0.2 N HCl 12 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Nach Einstellen des pH auf etwa 3-4 wurde 1 µl der wässrigen Lösung direkt gaschromatographisch analysiert (Poropak). Propionsäure diente als innerer Standard.

6.2.3.9. O-Acetylbestimmung

Nach 3-4 stündiger Hydrolyse bei Raumtemperatur mit 0.05 N NaOH wurde der pH der Probe wie oben auf 3-4 gebracht und 1 µl der wässrigen Lösung direkt gaschromatographisch untersucht (Poropak). Aus der Differenz des Gesamt-Acetylwertes und des O-Acetylwertes kann man den N-Acetylgehalt errechnen.

6.2.4. Chromatographische Methoden

6.2.4.1. Dünnschichtchromatographie zur Untersuchung von Zuckern

LPS (1-2 mg) wurde 4 Stunden bei 100°C mit 1 ml 1 N H₂SO₄ hydrolysiert und anschließend mit IR-410 Ionenaustauscher neutralisiert. Zur Chromatographie wurden DC-Cellulose-Fertigplatten (Schichtdicke 0.1 mm, Merck) verwendet.

Fließmittel: Als Laufmittel Äthylacetat, Pyridin, Eisessig, Wasser (5:5:1:3) Vol/Vol

Als Atmosphäre Äthylacetat, Pyridin, Wasser (40:11:6) Vol/Vol

Nachweis: Mit alkalischer Silbernitratlösung nach Trevelyan (125)

6.2.4.2. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Isolierung von 3-Methoxyfettsäuren

Das Fettsäuregemisch wurde in Äther oder Chloroform gelöst und auf Kieselgel-60-Fertigplatten (Schichtdicke 0.25 mm, Merck) aufgetragen. Als Fließmittel wurde eine Mischung von Petroläther, Äther, Eisessig (35:15:1, Vol/Vol) verwendet, und die Detektion der Fettsäuren erfolgte mit Jod (Joddämpfe in einer Jodkammer). Als Standard dienten 3-Hydroxy- und 3-Methoxymyristinsäure. Die Bande, welche der 3-Methoxyfettsäure entsprach (R_f -Wert = 0.3-0.4) wurde von der Glasplatte abgekratzt und mit Äther eluiert.

6.2.4.3. Hochspannungspapierelektrophorese

Die Methode von Kickhöfen und Warth (56) diente zur präparativen Isolierung oder zur qualitativen Untersuchung von Neutral-, Aminosuktern, Disacchariden oder Zuckerphosphaten. Sie wurde bei 45 Volt/cm und 100-150 mA für ein bis drei Stunden durchgeführt. Es wurde Papier (Nr. 2043a oder b) der Firma Schleicher und Schüll verwendet (15 cm x 70 cm).

Fließmittel: Pyridin, Eisessig, Wasser (10:4:86, Vol/Vol, pH 5.3)

Sprühreagenzien: a) Für Phosphorsäureester: Ammoniummolybdat nach Hanes/Isherwood (39)

b) Für reduzierende Zucker: Alkalische Silbernitratlösung nach Trevelyan (135)

c) Für Aminosucker: 0.2%ige Ninhydrinlösung in Aceton.

6.2.4.4. Der Aminosäureanalysator

Für die qualitative oder quantitative Bestimmung von Aminosukcern und deren Phosphorsäureestern (sowie von Aminosäuren) wurde ein automatischer Aminosäureanalysator (Modell Durrum D-500) benutzt. Für die Elution der Substanzen wurden dabei folgende Puffer und Programme verwendet:

Citrat-Puffer für Aminosäureanalysator Durrum D-500

	<u>A</u>	<u>B₁</u>	<u>B₂</u>	<u>C</u>
Molarität	0.20 M	0.20 M	0.38 M	1.10 M
Na-Citrat x 2H ₂ O	19.61 g	19.61 g	wie B ₁	39.22 g
Na-Cl	-	-	aber durch	40.90 g
Thiodiglycol	5 ml	5 ml	Zugabe von	-
HCl konz.	12.31 ml	8.37 ml	NaCl 0.38 M	0.3 ml
Phenol flüssig	1.0 ml	1.0 ml	machen	1.0 ml
Endvolumen	1.0 l	1.0 l		1.0 l
pH	3.29	4.25	4.25	7.90

<u>Programm</u>	<u>Puffer</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
P ₁	A	0'-28'	50°C = 0'-20'
	B ₁	28'-42'	65°C = 20'-95'
	B ₂	42'-57'	
	C	57'-95'	
P ₂	A	0'-28'	50°C = 0'-20'
	B ₁	28'-42'	65°C = 20'-100'
	B ₂	42'-100'	

Da die Aminosucker fettsäurefrei sein müssen und als Monosaccharide vorliegen sollten, wurden die Proben vor der Untersuchung mit dem Aminosäureanalysator mit 4 N HCl 10 Stunden lang bei 100°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure gründlich im Vakuumexsiccator über KOH-Rotuli entfernt. Falls andere Vorbehandlungen nötig waren, ist dies im Text erwähnt. (z.B. 4-Amin-arabinose, Disaccharide + Phosphat).

Die Extinktionen wurden bei den beiden Wellenlängen 440 nm und 590 nm gemessen.

6.2.4.5. Gaschromatographie

Die gaschromatographische Analyse wurde mit einem Varian Aerograph (1400) durchgeführt, der mit einem Flammenionisationsdetektor arbeitete. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 ml/Minute. In allen Fällen wurden gepackte Säulen verwendet, die mit folgenden stationären Phasen bestückt waren (jeweils auf Gas-Chrom Q, 100-120 mesh):

- a) SE-30, 10% für
 Fettsäuremethylester bei 180°C
 3-Lauroxymyristinsäuremethylester bei 260°C
 reduzierte permethylierte N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide bei 270°C
 permethylierte N-Acetyl-Aminozuckerphosphate bei 210°C
- b) SE-30, 3% für
 reduzierte, permethylierte N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide bei 210°C
- c) ECNSS-M, 3% für
 Alditolacetate (Neutral- und Aminozucker) bei 190°C
 permethylierte oder teilweise methylierte N-Acetylaminozucker bei 170°C
- d) OV-1, 3% für
 3-Lauroxymyristinsäuremethylester bei 220°C
 L-Phenyläthylamide der 3-Methoxyfettsäuren bei 225°C
- e) OV-17, 3% für
 reduzierte, permethylierte N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide bei 270°C
- f) OV-225, 3% für
 reduzierte, permethylierte N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide bei 260°C
- g) QF-1, 2.5% für
 reduzierte, permethylierte N-Acetyl-Glukosamin-Disaccharide bei 260°C

Als Schreiber und Integrator diente das Modell 3380 A der Firma Hewlett/Packard.

6.2.5. Massenspektrometrische Untersuchungen

Die Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma Finnigan (Modell 3200) aufgenommen, welches mit einem Gaschromatographen gekoppelt war.

Technische Daten: Elektronenenergie: 70 eV (2000 V Beschleunigungsspannung)

Emission: 0.35 mA

Scantime: 2 msec/Masse

6.3. Biologische und serologische Untersuchungsmethoden

6.3.1. Pyrogentest (in vivo): (nach Rietschel, 104)

6.3.1.1. Tiere

Für die Pyrogentests wurden männliche und weibliche Hybridkaninchen (helle Großsilber x Alaska) verwendet. Die Tiere hatten ein Gewicht von 1.7-2.2 kg und waren unter keimfreien Bedingungen aufgezogen worden.

6.3.1.2. Pyrogene

Das PCP-extrahierte LPS von Yersinia enterocolitica 161-45a wurde in pyrogenfreiem Wasser erhitzt (3 Min, 100°C) und durch Ultraschallbehandlung gelöst. Diese Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert und vor den Experimenten mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7.2, 0.15 M) verdünnt. Alle verwendeten Materialien waren steril und pyrogenfrei.

6.3.1.3. Art der Injektion und Temperaturmessung

Die Fieberbestimmungen wurden mit je 4 Kaninchen pro Versuch in einem klimatisierten Raum (20°C $\pm$ 1°C) durchgeführt. Die Injektion erfolgte in die Ohrvene. Die Körpertemperatur der Tiere wurde rektal mit einem Meßfühler ermittelt und mit einem Gerät der Firma Hartmann und Braun/Frankfurt aufgezeichnet.

6.3.2. Test der passiven Hämolysse (in vitro) (22)

6.3.2.1. Antigen = alkalibehandeltes Lipoid A (Lipoid A-OH, siehe auch 6.2.1.6.2.)

Lipoid A-OH wurde in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Puffer sollten nicht verwendet werden, da Lipoid A in Gegenwart von Salzen nicht gut löslich ist.

6.3.2.2. Beladen der Erythrozyten mit Lipoid A-OH

Es wurden Schafserythrozyten verwendet, die dreimal mit PBS gewaschen waren. Erythrozytensediment/0.2 ml wurden in 4 ml PBS suspendiert. Dazu wurden 25 µl Lipoid A-OH Lösung (entsprechend 50 µg Lipoid A-OH) gegeben und sofort gut durchgemischt. Die Zellen wurden dann inkubiert (30 Min., 37°C), anschließend dreimal mit PBS gewaschen und zum Schluß in 40 ml Veronalpuffer (0.5%) suspendiert. (Beim Inkubieren und Waschen der Zellen sollte kein Veronalpuffer benutzt werden, da zweiwertige Kationen zur Präzipitation von Lipoid A führen).

6.3.2.3. Antiseren

Antiseren, welche Antikörper gegen Erythrozyten enthalten, wurden vor dem Test mit Schafserythrozyten inkubiert, damit diese die Antikörper absorbieren. Das verwendete Antiserum enthielt Antikörper gegen Salmonella R 595 Lipoid A.

6.3.2.4. Absorption von Lipoid A-Antiseren

Schafserythrozyten (0.1 ml) wurden mit Yersinia enterocolitica 161-45a Lipoid A-OH beladen, mit 0.5 ml anti-Salmonella-Lipoid A-Antiserum 30 Minuten bei 0°C inkubiert und abzentrifugiert. Danach wurde das Antiserum mit dem Hämolysetest auf noch vorhandene anti-Salmonella-Lipoid A-Aktivität untersucht.

6.3.2.5. Meerschweinchen Komplement

Als Komplement-Quelle wurde Meerschweinchenserum verwendet. (Die Aktivität des Komplement gegen Schafserythrozyten sollte getestet und das Serum falls nötig bei 0°C mit Schafserythrozyten absorbiert werden). Vor dem Gebrauch wurde das Meerschweinchenserum 1:10 mit Veronalpuffer verdünnt. Von dieser Lösung wurden etwa 25 µl im Test verwendet (= 1 Tropfen mit einem standardisierten Tropfenzähler).

6.3.2.6. Bestimmung der Hämolyse in Hämagglutinations-Titerplatten

Aus 50 µl Antiserum wurden mit 50 µl Veronalpuffer eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zu jeder Verdünnung wurden 50 µl mit Lipoid A-OH beladene Schafserythrozyten und 1 Tropfen (etwa 25 µl) Komplement hinzugefügt. Nach vorsichtigem Schütteln der Platte wurde diese für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

6.3.2.7. Bestimmung der passiven Hämolysehemmung

Etwa 6 µg Antigen (Lipoid A-OH) wurden in 25 µl Veronalpuffer gelöst. Daraus wurde mit weiteren 25 µl Veronalpuffer eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zu jeder Verdünnung wurden 25 µl anti-Salmonella-Lipoid A-

Antiserum (Verdünnung etwa 1:200) gegeben und die Titerplatte 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Schafserythrozyten dazugegeben (beladen mit Salmonella Lipoid A = homolog, mit Yersinia Lipoid A = heterolog) und zum Schluß 25 µl Komplement. In den Fällen, bei denen das Antigen mit dem Antiserum reagierte, wurde die Lyse gehemmt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, G.A. und Singh, P.P., 1970.
Biochem. Biophys. Acta, 202, 553.
2. Adams, G.A. und Singh, P.P., 1970.
Can. J. Biochem., 48, 55.
3. Alexander, P. und Evans, R., 1971.
Nature, 232, 76.
4. Ames, G.F., Spudich, E.N. und Nikaido, H., 1974.
J. Bacteriol., 177, 406.
5. Aminoff, D., 1961.
Biochem. J., 81, 384-391.
6. Anderson, J., Melchers, F., Galanos, C. und Lüderitz, O., 1973.
J. Exp. Med., 137, 943.
7. Andreessen, R., 1974.
Doktorarbeit, Universität Freiburg.
8. Apte, R.N., Galanos, C. und Pluznik, D.V., 1975.
J. Cell. Physiol., 87, 71.
9. Beckmann, J., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1964.
Biochem. Z., 339, 401.
10. Bona, C., Damais, C., Galanos, C. und Chedid, L., 1975.
In B. Urbaschek, R. Urbaschek und E. Neter (eds.). Gram negative
Bacterial Infections and Mode of Endotoxin Actions, p. 182. Springer
Verlag, New York.
11. Bryn, K. und Rietschel, E.Th., 1977.
Eur. J. Biochem., 86, 311-315.

12. Caroff, M. und Szabo, L., 1979.
Biochem. Biophys. Res. Com., 89, 410-413.
13. Closse, A.M., 1960.
Doktorarbeit, Universität Freiburg.
14. Dey, P.K., Feldberg, W. und Wendlandt, S., 1974.
J. Physiol. (Lond.), 239, 102.
15. Drews, G., Weckesser, J. und Mayer, H., 1977.
Cell envelopes Chap. 4. In R.K. Clayton and W.R. Sistrom (ed.) The
Photosynthetic Bact., Plenum Press, N.Y.
16. Erler, W., Feist, H. und Flossmann, K.D., 1977.
Arch. exper. Vet. med. Leipzig, 31, 203-209.
17. Finne, J. und Rauvala, H., 1977.
Carb. Res., 58, 57-64.
18. Freudenberg, M. und Galanos, C., 1978.
Infect. Immun., 19, 875-882.
19. Fromme, I. und Beilharz, H., 1978.
Analyt. Biochem., 84, 347-353.
20. Galanos, C., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1969.
Eur. J. Biochem., 9, 245-249.
21. Galanos, C., Rietschel, E.Th., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1971.
Eur. J. Biochem., 19, 143-152.
22. Galanos, C., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1971.
Eur. J. Biochem., 24, 116-122.
23. Galanos, C., Rietschel, F.Th., Lüderitz, O., Westphal, O., Kim, Y.B. und
Watson, D.W., 1972.
Eur. J. Biochem., 31, 230.

24. Galanos, C. und Lüderitz, O., 1975.
Eur. J. Biochem., 54, 603-610.
25. Galanos, C., 1975.
Z. Immun. Forsch., 149, 214-299.
26. Galanos, C., Freudenberg, M., Hase, S., Jay, F. und Ruschmann, E., 1977.
Microbiology, 1977, 269-276.
27. Galanos, C., Roppel, J., Weckesser, J., Rietschel, E.Th. und Mayer, H., 1977.
Infect. Immun., 16, 407-412.
28. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.Th. und Westphal, O., 1977.
Int. Rev. Biochem., 14, 239-335.
29. Ghaleb, M.A., Levine, E.M. und Heath, E., 1966.
J. Biol. Chem., 241, 3207-3215.
30. Gmeiner, J., 1968.
Doktorarbeit, Universität Freiburg.
31. Gmeiner, J., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1969.
Eur. J. Biochem., 7, 370-379.
32. Gmeiner, J., Simon, M. und Lüderitz, O., 1971.
Eur. J. Biochem., 21, 355-356.
33. Gorbach, V.J., Krasikova, J.N., Lukyanov, P.A., Razmakhina, O.Y., Solov'Eva, T. und Ovodov, Y.S., 1979.
Eur. J. Biochem., 98, 83-86.
34. Gordon, S., Unkeless, J.C. und Cohn, Z.A., 1974.
J. Exp. Med., 140, 995.
35. Greer, G.G. und Rietschel, E.Th., 1978.
Infect. and Immun., 19, 357-368.

36. Greer, G.G. und Rietschel, E.Th., 1978.
Infect. Immun., 20, 366-374.
37. Haeffner, N., Chaby, R. und Szabo, L., 1977.
Eur. J. Biochem., 77, 535-544.
38. Hakomori, S., 1964.
J. Biochem., 55, 205-207.
39. Hanes, C.S., Isherwood, F.A., 1949.
Nature 164, 1107-1112.
40. Hase, S. und Rietschel, E.Th., 1976.
Eur. J. Biochem., 63, 93-99.
41. Hase, S. und Rietschel, E.Th., 1976.
Eur. J. Biochem., 63, 101-107.
42. Hase, S., Hofstad, T. und Rietschel, E.Th., 1977.
J. Bact., 129, 9-14.
43. Hase, S. und Rietschel, E.Th., 1977.
Eur. J. Biochem., 75, 23-34.
44. Hausmann, E., Lüderitz, O., Knox, K. und Weinfeld, N., 1975.
45. Hewlett, G., Galanos, C. und Rietschel, E.Th., unveröffentlichte Ergebnisse.
46. Janossy, H., Humphrey, J.H., Perys, M.B. und Greaves, M.F., 1973.
Nature 245, 108.
47. Jay, F., 1978.
Thesis, Guildford, England.
48. Kadis, S., Weinbaum, G. und Ajl, S.J., 1971.
Microbial Toxins, Vol. V, Academic Press, N.Y.

49. Kamio, Y., Kim, K.C. und Takahashi, H., 1971.
J. Biochem., 70, 187-191.
50. Karkhanis, D., Zeltner, J., Jackson, J. und Carlo, D., 1978.
Analyt. Biochem., 85, 595-601.
51. Kärkkäinen, J., 1970.
Carb. Res., 14, 27-33.
52. Kasai, N., Aoki, Y., Watanabe, T., Odaka, T. und Yamamoto, T., 1961.
Jap. J. Microbiol., 5, 347.
53. Kasai, N. und Nowotny, A., 1967.
J. Bact., 94, 1824-1836.
54. Kaufmann, F., 1960.
Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Abt. I., Orig., 178, 442.
55. Kickhöfen, B. und Westphal, O., 1952.
Z. Naturforschung 7b, 655-659.
56. Kickhöfen, B. und Warth, R., 1968.
J. Chromatogr., 33, 558-560.
57. Kim, Y.B. und Watson, D.W., 1967.
J. Bact., 94, 1320-1326.
58. Kotchetkov, N.K. und Chizov, O.S., 1966.
Adv. Carb. Chem., 21, 39-93.
59. Kolb, C., DiPauli, R. und Weiler, E., 1974.
J. Exp. Med., 139, 467.
60. Krasikova, J.N., Gorbach, V.I., Solov'Eva, T.F. und Ovodov, Y.S., 1978.
Eur. J. Biochem., 89, 287-289.
61. Kraska, U., Paugny, J.R. und Sinay, P., 1976.
Carb. Res., 50, 181-190.

62. Kuhn, R. und Krüger, G., 1957.
Chem. Berichte, 90, 264.
63. Leblanc, D.J. und Ball, A.J.S., 1978.
Analyt. Biochem., 84, 574-578.
64. Lehmann, V. und Rupprecht, E., 1977.
Eur. J. Biochem., 81, 443-452.
65. Lehmann, V., 1977.
Eur. J. Biochem., 75, 257-266.
66. Lehmann, V., Rupprecht, E. und Osborn, M.J., 1977.
Eur. J. Biochem., 76, 41-49.
67. Lehmann, V., Redmond, J., Egan, A. und Minner, I., 1978.
Eur. J. Biochem., 86, 487-496.
68. Lönngren, J. und Svensson, S., 1974.
Adv. Carbohydr. Chem., 29, 89-91.
69. Lowry, O.H., Roberts, N., Leiner, K., Wu, M. und Farr, L., 1954.
J. Biol. Chem., 207, 1-17.
70. Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. und Nikaido, H., 1971.
Microbial Toxins, Vol. IV, Acad. Press, N.Y., 145-233, in Weinbaum, G., Kadis, S. und Ajl, S.J. (eds.).
71. Lüderitz, O., Galanos, C., Risse, H.J., Ruschmann, E., Schlecht, S., Schmidt, G., Schulte-Holthausen, H., Wheat, R., Westphal, O. und Schlosshardt, J., 1966.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 133-277.
72. Lüderitz, O., Staub, A.M. und Westphal, O., 1966.
Bact. Rev., 30, 192.
73. Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Nurminen, M., Rietschel, E.Th., Rosenfelder, G., Simon, M. und Westphal, O., 1973.
J. Infect. Dis., 128, 9-21.

74. Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Mayer, H., Rietschel, E.Th. und Weckesser, J., 1978.
Naturwissenschaften, 65, 578-585.
75. Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V. und Rietschel, E.Th., 1974.
J. Hyg. Epid. Microbiol. and Immun., 18, 381-390.
76. Lugowski, C. und Romanowska, E., 1974.
Eur. J. Biochem., 48, 319-323.
77. Mäkelä, P.H. und Stocker, B.A.D., 1969.
Ann. Rev. Genetics 3, 291.
78. Mononen, J., Finne, J. und Kärkkäinen, J., 1978.
Carb. Res., 60, 371-375.
79. Morgan, W.T.J. und Elson, L.A., 1934.
Biochem. J., 28, 988.
80. Morrison, D.C. und Cochrane, C.G., 1974.
J. Exp. Med., 140, 797.
81. Mühlradt, P.F., Menzel, J., Golecki, J.R. und Speth, V., 1974.
Eur. J. Biochem., 43, 533-539.
82. Mühlradt, P., 1975.
Biologie in unserer Zeit, 5, 33.
83. Mühlradt, R., Wray, V. und Lehmann, V., 1977.
Eur. J. Biochem., 81, 193-203.
84. Munson, R.S., Rasmussen, N.S. und Osborn, M.J., 1978.
J. Biol. Chem., 253, 1503-1511.
85. Neter, E., Anzai, H., Gorzynski, E.A., Novotny, A. und Westphal, O., 1960.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103, 783.

86. Nikaido, H., 1973.
Biosynthesis and assembly of LPS and the outer membrane layer of gram-negative cell wall, p. 131-208, in Leive, L., (ed.), Bacterial membranes and walls, Marcel Dekker Inc., N.Y.
87. Nikaido, H., 1979.
Angew. Chem., 91, 394-407.
88. Novotny, A., 1969.
Bacteriol. Rev., 33, 72.
89. Novotny, A., 1961.
J. Am. Chem. Soc., 83, 501.
90. Osborn, M.J., 1969.
Ann. Rev. Biochem., 38, 501-538.
91. Parant, M. und Galanos, C.,
unveröffentlichte Ergebnisse.
92. Paulsen, H. und Stenzel, W., 1978.
Chem. Ber., 111, 2334-2347.
93. Paulsen, H. und Stenzel, W., 1978.
Chem. Ber., 111, 2348-2357.
94. Paulsen, H. und Stenzel, W., 1978.
Chem. Ber., 111, 2358-2369.
95. Peavy, D.L., Shands, J.W., Adler, W.H. und Smith, R.F., 1973.
J. Immunol., 111, 352.
96. Phillips, S.M., Stephanson, J.R., Greenburger, J.S., Lane, P.E. und Aaronson, A.A., 1976.
J. Immunol., 116, 1123.
97. Pettit, G.R., Einck, J.J. und Brown, P., 1978.
Biomed. Mass. Spectrom., 5, 153-160.

98. Radziejewska-Lebrecht, J., Feige, U., Jensen, M., Kotelko, K., Fribohn, H. und Mayer, H., 1980.
im Druck.
99. Reed, L.J. und Muench, H., 1938.
Amer. J. Hyg., 27, 493.
100. Rietschel, E.Th., Galanos, C. und Lüderitz, O., 1975.
Microbiology, 1975, 307.
101. Rietschel, E.Th., Gottert, H., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1972.
Eur. J. Biochem., 28, 166-173.
102. Rietschel, E.Th., Kim, Y.B., Watson, D.W., Galanos, C., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1973.
Infection and Immun., 8, 173-177.
103. Rietschel, E.Th. und Lüderitz, O., 1975.
Z. Immun. Forsch. Bd., 149, 201-213.
104. Rietschel, E.Th., Hase, S., King, M.T., Redmond, J. und Lehmann, V., 1977.
Microbiology, 1977, 262-268.
105. Rietschel, E.Th., 1976.
Eur. J. Biochem., 64, 423-428.
106. Rietschel, E.Th. und Galanos, C., 1977.
Infect. Immun., 15, 34-49.
107. Rietschel, E.Th., 1980.
Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. IX.
108. Rietschel, E.Th., Greer, G., Jensen, M., Schade, U. und Sidorczyk, S., 1978.
Arzneim.-Forsch./Drug. Res., 28 (II), 1203.

109. Rondle, C.J.M. und Morgan, W.T.J., 1955.
Biochem. Journ., 61, 586-589.
110. Roppel, J., Mayer, H. und Weckesser, J., 1975.
Carb. Res., 40, 31-40.
111. Rosenstreich, D.L., Novotny, A., Chused, T. und Mergenhagen, S.E., 1973.
Infect. Immun., 8, 406.
112. Rosner, M.R. und Khorana, H.G., 1979.
J. Biol. Chem., 254, 5918-5925.
113. Rosner, M.R., Tang, J., Barzilay, J. und Khorana, H.G., 1979.
J. Biol. Chem., 254, 5906-5917.
114. Rosner, M.R., Verret, R.C. und Khorana, H.G., 1979.
J. Biol. Chem., 254, 5926-5933.
115. El-Sabbagh, M., 1978.
Dissertation, Universität Freiburg.
116. Sawardeker, J.S., Sloneker, H.J. und Jeanes, A., 1965.
Analytic. Chem., 37, 1602-1604.
117. Schlecht, S. und Fromme, I., 1977.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 239, 178-188.
118. Schram, K.H., Taniguchi, Y. und McCloskey, J.A., 1978.
J. Chrom., 155, 355-361.
119. Shands, J.W.Jr., 1971.
Microbial Toxins (Weinbaum, G., Kadis, S. und Ajl, S.J., ed.)
Vol. IV, Acad. Press. N.Y.
120. Smith, S.M. und Synder, J.S., 1975.
Infect. Immun., 12, 993.

121. Steves, R.A. und Grundke-Iqbal, 1976.
J. Nat. Cancer Inst., 56, 541.
122. Stellner, K., Saito, H. und Hakomori, S.I., 1973.
Arch. Biochem. Biophys., 155, 464-472.
123. Strominger, J., Park, J.T. und Thompson, R., 1959.
J. Biol. Chem., 234, 3263-3267.
124. Tharanathan, R.N., Weckesser, J. und Mayer, H., 1978.
Eur. J. Biochem., 84, 385-394.
125. Trevelyan, W.E., Procter, D.P. und Harrison, J.S., 1950.
Nature, 166, 44.
126. Volk, W.A., Galanos, C. und Lüderitz, O., 1970.
Eur. J. Biochem., 17, 223-229.
127. Volk, W.A. und Lüderitz, O., 1980.
im Druck, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. IX.
128. Weckesser, J., Katz, A., Drews, G., Mayer, H. und Fromme, I., 1974.
J. Bact., 120, 672-678.
129. Weckesser, J., Drews, G. und Mayer, H., 1977.
Naturwissenschaftliche Rundschau, 30, 360-364.
130. Weisbach, A. und Hurwitch, I., 1959.
J. Biol. Chem., 234, 705.
131. Westenfelder, M., Galanos, C. und Madsen, P.O., 1975.
Invest. Urol., 5, 337.
132. Westphal, O. und Lüderitz, O., 1952.
Z. Naturforschg., 76, 148-155.

133. Westphal, O. und Lüderitz, O., 1954.
Angew. Chem., 66, 407.
134. Wilkinson, S.G., Galbraith, L. und Lightfoot, G.A., 1973.
Eur. J. Biochem., 33, 158-174.
135. Wollenweber, H., 1979.
Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
136. Yin, T., Galanos, C., Kinsky, S., Bradshaw, R.A., Wessler, S., Lüderitz, O. und Sarmiento, M.E., 1972.
Biochim. Biophys. Acta, 261, 284.
137. Yoshida, M., Rietschel, E.Th., Galanos, C., Hirata, M., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1972.
J. Med. J. Sci. Biol., 25, 238.
138. Sidorczyk, S., Jensen, M. und Rietschel, E.Th.
The Chemical Structure of the Lipoid A-Component from *Proteus mirabilis*, in Vorbereitung.
139. Rietschel, E.Th., Schade, U., Lüderitz, O., Fischer, H. und Peskar, B.A., 1980.
Microbiology, 1980 (D. Schlessinger, ed.), Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
140. Schade, U. und Rietschel, E.Th., 1979.
Toxicon 17, (Suppl. A.), 162 (1979).
141. Wilkinson, S.G. und Taylor, D.P., 1978.
J. Gen. Microbiol., 109, 367-370.

LEBENS LAUF

24.10.1952	Geboren als Sohn des Apothekers Werner Jensen und seiner Ehefrau Karin, geb. Berg, in Hildesheim/Niedersachsen
1959-1963	Besuch der Volksschule
1963-1971	Besuch des humanistischen Gymnasiums Andreanum
April 1971	Reifeprüfung
August 1971 - Juli 1973	Ausbildung als Apothekerpraktikant in der Rats-Apotheke in Einbeck
Juli 1973	Pharmazeutische Vorprüfung (in Hildesheim)
Oktober 1973 - März 1977	Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs-Universität/Freiburg
September 1975	Erste pharmazeutische Prüfung
März 1977	Zweite pharmazeutische Prüfung
Mai 1977	Erhalt der Approbation als Apotheker
Juni 1977 -Dezember 1979	Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg unter Leitung von Dr. habil. E. Th. Rietschel.

